



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

藥學博士 學位 청구 論文

간성상세포 조절 G protein 매개 간섬유화 타겟

**Antifibrotic targets in hepatic stellate cells regulated by
G protein signaling pathway**

2017년 2월

서울대학교 대학원

약학과 약물학 전공

김 규 민

국문요약

간성상세포 조절 G protein 매개 간섬유화 타겟
**Antifibrotic targets in hepatic stellate cells regulated by G
protein signaling pathway**

김 규 민

지도교수: 김 상 진

특정 G 단백질과의 결합을 통해 활성화되는 G 단백질 결합 수용체 (G protein-coupled receptor, GPCR)를 통한 신호 전달은 $G\alpha$ 단백질의 활성화에 의해 하위 신호와 세포 생리가 변화한다. 따라서 $G\alpha$ 단백질 발현의 증감은 세포 기능의 증폭 또는 경감에 크게 기여할 수 있다. $G\alpha$ 단백질 소단위체 중 가장 강력한 형질전환능을 가진 $G\alpha_{12}$ 는 세포의 증식, 이동에 관여하여 주목 받았다. 간 생리 분야에서는 $G\alpha_{12}$ 와 결합하는 GPCR 뿐만 아니라 이들 리간드들이 간성상세포의 활성화 및 간섬유화 환경에서 증가되어 있으므로, 간성상세포 내 $G\alpha_{12}$ 발현은 GPCR 관련 신호를 증폭 또는 감소시키는데 기여할 것으로 예측된다. 그럼에도 불구하고 간성상세포에서 $G\alpha_{12}$ 의 발현과 기능 및 발현 조절 기전에 관한 연구는 전무하다.

본 연구에서는 ‘간성상세포에서 $G\alpha_{12}$ 의 발현 증가가 GPCR 관련 신호를

증폭시킴으로써 간섬유화 진행을 촉진하고, 이 과정에 간성상세포 특이적인 자가포식 현상이 발생한다'는 가설을 제기한다. 이를 증명하기 위한 구체적인 연구 목표로 1) $G\alpha_{12}$ 가 활성화된 간성상세포에서 발현이 증가하는지의 여부, 증가한다면 $G\alpha_{12}$ 의 발현 변화가 간섬유화를 촉진시킬 것인지를 탐구, 2) $G\alpha_{12}$ 발현 증가가 매개된 간성상세포 활성화에서의 분자적 기전으로 특정 마이크로 RNA 변화의 매개 가능성, 3) $G\alpha_{12}$ 의존적 간성상세포 활성화가 특정 자가포식 관련 단백질을 조절하여 세포의 자가포식 현상을 증가시키는지 규명하고자 하였다.

첫째, $G\alpha_{12}$ 의 발현과 이의 기능을 활성화된 간성상세포와 간섬유화 모델에서 탐구하였다. 간섬유화 동물 모델 및 활성화된 간성상세포에서 $G\alpha_{12}$ 발현이 증가함을 관찰하였고, 간섬유화 조직에서의 $G\alpha_{12}$ 발현 염색 패턴이 α -SMA와 유사함을 발견하였다. 이와 함께 $G\alpha_{12}$ 결손 마우스에서 사염화탄소 투여에 의해 유도되는 간섬유화가 효과적으로 억제됨을 증명하였다. 이러한 현상은 간성상세포 특이적으로 $G\alpha_{12}$ 를 발현하는 렌티바이러스를 투여하였을 때 반전되었다. 이와 같은 맥락으로, LX-2 세포에 $G\alpha_{12}$ 활성화형 돌연변이 벡터를 형질 도입시켰을 때 활성화 지표들이 증가한 반면 $G\alpha_{12}$ 결손 마우스에서 분리된 일차 성상세포에서는 활성화 지표들이 감소하였다.

둘째, $G\alpha_{12}$ 의 발현 변화 기전으로서 마이크로 RNA를 관찰하였다. $G\alpha_{12}$ mRNA의 3'-UTR 부위에 결합한다고 추정되는 마이크로 RNA 중에서 miR-16은 휴지 상태의 간성상세포에서 가장 많은 양을 차지하면서 높은 결합력을

가진 마이크로 RNA였으며 이는 간성상세포 활성화 과정에서 하향조절되었다. 또한, 간섬유화동물모델 및 인간 간섬유화샘플에서 miR-16의 발현 또한 경감하였다. 이와 더불어 실제로 miR-16이 $G\alpha_{12}$ 의 합성을 저해함을 miR-16 유사체 및 저해제를 이용하여 증명하였다.


셋째, $G\alpha_{12}$ 의 발현 증가가 자가포식 현상을 유도하여 간성상세포의 활성화 및 간섬유화를 촉진하는지 여부를 탐구하였다. 최근, 자가포식 현상은 간성상세포 활성화 및 간섬유화를 촉진시키는 현상으로서의 중요성이 보고되었다. 간성상세포에서의 $G\alpha_{12}$ 발현 증가가 자가포식 현상을 유도하였고, 이 과정에는 JNK 의존적 ATG12-5 결합을 수반함을 증명하였다. $G\alpha_{12}$ 를 조절하는 인자인 miR-16 또한 자가포식 현상을 조절함을 보였다.

종합할 때, 본 연구에서는 1) 간섬유화 과정에서 간성상세포의 활성화를 조절하는 분자로서 $G\alpha_{12}$ 발현이 증가하고, 이러한 변화는 병적 상태에서 간섬유화를 촉진하며, 2) 이러한 $G\alpha_{12}$ 를 제어하는 신규 조절 분자로서 간성상세포에 풍부한 miR-16을 발굴하였다. 또한, 3) $G\alpha_{12}$ 는 JNK를 매개로 한 ATG12-5의 형성을 유도하여 자가포식 현상을 활성화하는 현상을 밝힘으로써 $G\alpha_{12}$ 의 기능 및 작용 원리를 간성상세포의 활성화 조절 측면에서 새롭게 규명하였다. 이상의 연구 결과는 간성상세포를 조절하는 핵심 분자인 $G\alpha_{12}$ 및 이의 발현과 연계된 상하위 타겟들을 조절한다면 간섬유화를 치료 및 예방할 수 있다는 새로운 전략을 제시한다.

주요어: 간섬유화, 간성상세포, $G\alpha_{12}$, 마이크로 RNA, miR-16, 자가포식 현상,
ATG12-5, JNK

학번: 2011-30501

목 차

| | |
|---|-------|
| 국문요약..... | i |
| 목차..... | v |
| List of figures | viii |
| List of abbreviations | ix |
| I. 서론 | 1 |
| II. 연구재료 및 방법 | |
| 시약 및 재료..... | 8 |
| 인체 조직 시료..... | 8 |
| 면역조직화학적 염색..... | 9 |
| 세포 배양..... | 9 |
| 병리 동물모델..... | 10 |
| 면역화학적 분석..... | 11 |
| Total RNA 분리, RT-PCR 및 Real-time RT-PCR..... | 11 |
| 타겟화된 유전자 전달 (Targeted gene delivery) | 13 |
|  | 14 |
| 형질도입..... | 15 |
| G α_{12} 3'-UTR 리포터 유전자 분석..... | 15 |
| 아데노바이러스를 이용한 G α_{12} QL 및 mcherry-GFP-LC3 감염..... | 16 |
| 유전자 발현 데이터 분석..... | 16 |
| 공초점현미경 분석..... | 16 |
| 통계분석..... | |
| III. 연구 결과 | |

| | |
|--|----|
| Part I : 간섬유화 모델 및 간성상세포에서의 $G\alpha_{12}$ 의 발현 및 간섬유화 과정에서의 기능 | |
| 1. 간조직 내에서의 $G\alpha$ 소단위체들의 발현 비교..... | 17 |
| 2. 간섬유화 동물 모델 및 활성화된 간성상세포에서 $G\alpha_{12}$ 의 발현 변화..... | 19 |
| 3. 간섬유화 동물 모델 및 활성화된 간성상세포에서 $G\alpha_{13}$ 의 발현 변화..... | 21 |
| 4. 인간 간섬유화 유전자 발현 데이터에서의 $G\alpha_{12}$ family와 결합하는 G 단백 결합 수용체들의 발현 변화..... | 23 |
| 5. $G\alpha_{12}$ 결손에 의한 간섬유화 현상 억제..... | 25 |
| 6. $G\alpha_{12}$ 결손에 의한 간손상 억제..... | 28 |
| 7. 간성상세포 특이적 $G\alpha_{12}$ 발현에 의한 간섬유화 유도..... | 30 |
| 8. 간성상세포 특이적 $G\alpha_{12}$ 발현이 간손상에 미치는 영향..... | 33 |
| Part II : $G\alpha_{12}$ 의 발현 조절 메커니즘 | |
| 1. 활성화된 간성상세포 및 간섬유화 동물 모델에서 $G\alpha_{12}$ 의 mRNA 발현 관찰..... | 36 |
| 2. $G\alpha_{12}$ 의 발현의 새로운 조절자 miR-16 도출..... | 38 |
| 3. 간성상세포에서 다른 $G\alpha_{12}$ 의 발현 조절자로 예측된 마이크로 RNA의 발현 관찰..... | 41 |
| 4. 간섬유화 동물 모델 및 인간간섬유화 조직에서의 miR-16 변화..... | 43 |
| 5. miR-16에 의한 $G\alpha_{12}$ 의 직접적 발현 억제..... | 45 |
| Part III : 증가된 $G\alpha_{12}$ 에 의해 유도된 자가포식 현상 | |
| 1. $G\alpha_{12}$ 에 의한 간성상세포의 자가포식 현상 활성화..... | 48 |
| 2. $G\alpha_{12}$ 에 의한 간성상세포 자가포식 현상 유도에서의 자가포식 현상 관련 단백 및 간성상세포 활성화 지표 관찰..... | 52 |
| 3. $G\alpha_{12}$ 에 의한 자가포식 현상 유도 과정 중 ATG12-5 발현 변화에서 JNK의 역할..... | 55 |
| 4. miR-16 발현 변화가 자가포식 현상에 미치는 효과..... | 57 |

| | |
|--|-----------|
| IV. 고찰 | 60 |
| V. 참고문헌 | 69 |
| VI. 영문요약 | 79 |
| VII. Curriculum Vitae (Kyu Min Kim) | 82 |
| VIII. 감사의 글 | 86 |

List of figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. $G\alpha_{12}$ showed the highest signal intensities specifically in HSCs..... | 18 |
| Figure 2. $G\alpha_{12}$ was overexpressed in activated HSCs and in fibrotic liver tissue..... | 20 |
| Figure 3. $G\alpha_{13}$ was not comparably induced in fibrotic liver samples and activated HSCs..... | 22 |
| Figure 4. Transcript levels of representative GPCRs coupled to $G\alpha_{12}$ family members in patients with liver cirrhosis or healthy individuals (GSE25097)..... | 24 |
| Figure 5. Liver fibrosis was inhibited by $G\alpha_{12}$ KO..... | 26 |
| Figure 6. Liver injury was inhibited by $G\alpha_{12}$ KO..... | 29 |
| Figure 7. HSC-specific lentiviral delivery of $G\alpha_{12}$ exacerbated liver fibrosis..... | 31 |
| Figure 8. HSC-specific lentiviral delivery of $G\alpha_{12}$ tended to aggravated liver injury..... | 34 |
| Figure 9. $G\alpha_{12}$ was post-transcriptionally regulated | 37 |
| Figure 10. miR-16 was dysregulated during HSC activation | 39 |
| Figure 11. Other predicted miRs were also downregulated during HSC activation..... | 42 |
| Figure 12. Dysregulation of miR-16 was observed in liver tissues from fibrotic animal model and patients..... | 44 |
| Figure 13. miR-16 directly inhibited $G\alpha_{12}$ | 46 |
| Figure 14. $G\alpha_{12}$ activated autophagy in HSCs | 50 |
| Figure 15. Changes of HSC activation and autophagy markers with $G\alpha_{12}$ modulation..... | 53 |
| Figure 16. $G\alpha_{12}$ activated autophagy in HSCs via ATG12-5 formation in a JNK1/2-dependent manner..... | 56 |
| Figure 17. Dysregulation of miR-16 promoted autophagy in HSCs..... | 58 |

List of abbreviations

ALT: Alanine aminotransferase
 α -SMA: α -smooth muscle actin
Ang II: Angiotensin II
AST: Aspartate aminotransferase
ATGs : Autophagy-related genes
CCl₄: Carbon tetrachloride
ET-1: Endothelin-1
ECM: Extracellular matrix
G α : Guanine nucleotide-binding α -subunits
G α ₁₂QL: Active mutant of G α ₁₂
GEO: Gene Expression Omnibus
GPCRs: G protein-coupled receptors
GFP: Green fluorescence protein
HSCs: Hepatic stellate cells
JNK: c-Jun N-terminal kinase
KO: Knockout
LC3: Microtubule-associated protein 1 light chain 3
LDH: Lactate dehydrogenase
LPA: Lysophosphatidic acid
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
miR: MicroRNA
mRNA: Messenger RNA
PAI-1: Plasminogen activator inhibitor 1
PDGF: Platelet-derived growth factor
PBS: Phosphate-buffered saline
RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction
RFP: Red fluorescence protein
S1P: Sphingosine-1-phosphate
SDS: Sodium dodecylsulfate

TGFβ1: transforming growth factor β1

3'-UTR: 3'-untranslated region

WT: Wild-type

I. 서론

I-1. 간섭유화 모델 및 간성상세포에서의 $G\alpha_{12}$ 의 발현 및 간섭유화 과정에서의 기능

1. G 단백질 결합 수용체와 G 단백질에 의한 신호 전달 및 $G\alpha$ 단백질 발현 변화의 중요성

G 단백질 결합 수용체 (G protein-coupled receptor, GPCR)는 세포 외의 리간드들을 인식하고 다양한 하위 신호 전달 체계를 활성화시키는 수용체로써 여러 생물학적 기능을 조절함이 잘 알려져 있다 (Trzaskowski et al. 2012). GPCR의 활성화는 특정 heterotrimeric 구아닌 뉴클레오타이드가 결합된 단백질 (G 단백질)과의 물리화학적으로 결합으로 인해 이루어지는 것으로 알려져 있으며, 이 결합은 mitogen-activated protein kinase (MAPK)를 비롯한 세포 내 하위 신호 전달을 유도한다. 즉, G 단백질은 다양한 GPCR들의 신호를 인지하고 수용체로부터 전달된 신호를 하위 분자로 보내는 역할을 한다. 이러한 G 단백질은 α , β 및 γ 3개의 subunit으로 구성되어 있는 것으로 알려져 있다 (Oldham and Hamm 2008, Neves, Ram and Iyengar 2002). 또한, G 단백질 α subunit의 종류에 따라 GPCR의 역할이 달라지는 것으로 알려져 있다. 즉, 같은 GPCR에 여러 종류의 $G\alpha$ 단백질이 결합될 수 있으므로 같은 GPCR이 활성화되더라도 어떤 $G\alpha$ 단백질과 결합되어 신호가 전달되는지에 따라 차별적인 세포 반응이 유도된다 (Rozengurt 2007). 또한, $G\alpha$ 단백질은 다양한 GPCR들의 신호를 인지하고 수용체로부터 전달된 신호를 하위 분자로 보내는 역할을 하기

때문에 $G\alpha$ 단백질의 발현 양에 의해 GPCR 하위 신호가 증폭 또는 감소될 수 있다. 따라서 $G\alpha$ 단백질의 발현의 증감은 세포 반응 조절에 있어 큰 역할을 할 수 있다. 실제 G 단백질의 발현 변화는 장기간 동안의 리간드-GPCR 결합에 의해 유도되는 것으로 알려져 있으며, 이러한 변화로 인하여 심부전, 비만, 인슐린 저항성, 갑상선기능저하와 같은 다양한 질병을 유발한다고 알려져 있다 (Milligan and Green 1991, Wise et al. 1995, Horn et al. 1995, Kaartinen, LaNoue and Ohisalo 1994, Gordeladze et al. 1994).

2. $G\alpha_{12}$ 와 이와 관련된 간성상세포 활성화 환경에서의 연구

$G\alpha$ 단백질은 아미노산 서열의 유사성에 따라 4개의 패밀리 ($G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$)로 구분되며, 이 중에서 $G\alpha_{12}$ 패밀리가 가장 강력한 형질전환능을 가지고 있기 때문에 연구자들의 관심을 가져왔다 (Kelly, Casey and Meigs 2007, Radhika and Dhanasekaran 2001). 또한, 이 $G\alpha_{12}$ 패밀리는 $G\alpha_{12}$ 단백질과 $G\alpha_{13}$ 단백질 두 가지로 구성되어 있고 주요 장기 어디에서나 잘 발현이 되어 있는 것으로 보고되어 있다. 특히, $G\alpha_{12}$ 는 여러 신호 체계를 통하여 세포의 증식, 이동, 생존 등을 조절하는 신호를 전달한다 (Jung et al. 2014, Kang et al. 2003, Kawanabe et al. 2002, Goldsmith and Dhanasekaran 2007, Yang et al. 2015). 이와 더불어, $G\alpha_{12}$ 와 결합하는 특정 GPCR 리간드 (sphingosine-1-phosphate (S1P), lysophosphatidic acid (LPA), angiotensin II (Ang II), thrombin, endothelin-1 (ET-1)) 및 관련 GPCR들의 발현이 간성상세포의 활성화 및 간섬유화 환경에 증가됨이 알려져 있다 (Liu et al. 2011, Duplantier et al. 2004, Bataller et al. 2003, Rockey and

Chung 1996, Ikeda et al. 1998, Bahde et al. 2011, Cho et al. 2000, Anselmi et al. 2002, Li et al. 2011, Fiorucci et al. 2004, Yoshiji et al. 2001, Rancoule et al. 2011). 따라서 간성상세포 내 $G\alpha_{12}$ 의 발현은 다양한 GPCR들의 신호를 증폭 또는 감소시켜 간성상세포의 생화학적, 생리학적 활성화에 영향을 미칠 것이다. 그럼에도 불구하고 $G\alpha_{12}$ 의 발현과 기능 및 발현 조절 기전에 관한 연구는 현재까지 이루어지지 않은 실정이다.

I-2. $G\alpha_{12}$ 의 발현 조절 메커니즘

1. 마이크로 RNA와 간성상세포 전환 분화 조절

마이크로 RNA (miRNA, miR)는 최근 등장한 small RNA로 타겟 mRNA의 3' 비해석부위 (untranslated region, UTR)에 결합하여 유전자 발현을 억제하는 단백질 번역 후 발현 과정을 조절하는 분자이다. 이들은 다양한 타겟들의 발현을 변화시켜 분화, 증식과 같은 정상 발달 과정뿐만 아니라 간질환의 발병 및 진행을 조절한다 (Lakner, Bonkovsky and Schrum 2011). 특히, 간성상세포의 전환분화 과정에 많은 마이크로 RNA 발현양이 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다. 특히, 마이크로 RNA의 조절 이상이 간성상세포의 증식 속도를 높이고 세포 사멸을 감소시켜 간성상세포의 지속적인 활성화를 유도함이 관찰되었다 (Guo et al. 2009a, Guo et al. 2009b, Ji et al. 2009). miR-29b는 현저하게 Collagen1A1 (Col1A1), Col1A2의 발현을 감소시키고 간성상세포를 휴지기 상태로 유지시켰다 (Ogawa et al. 2010). miR-150, miR-194 또한

간성상세포 활성화 및 세포외기질 생성을 억제시켰으며, 이 과정은 c-myc, rac1의 발현을 억제하는 작용을 통해 이루어졌다 (Venugopal et al. 2010). 이와 더불어 miR-16은 Bcl-2 및 CyclinD1의 발현을 저해함으로써 간성상세포의 증식 및 사멸 저항성을 조절한다 (Guo et al. 2009b, Guo et al. 2009a, Landgraf et al. 2007). MiR-16이 간에서 풍부한 miRNA이며 간성상세포의 활성화에 영향을 미치는 것으로 인식되고 있지만 (Guo et al. 2009b, Guo et al. 2009a, Landgraf et al. 2007), 간섬유화에 있어서의 miR-16의 역할에 관해서는 충분히 밝혀지지 않았다. 또한, miR-16의 조절 이상과 $G\alpha_{12}$ 의 발현 변화와의 상관성이 간섬유화를 악화시킬지의 여부에 관해서는 주목한 바가 없다.

I-3. 증가된 $G\alpha_{12}$ 에 의해 유도된 자가포식 현상

1. 간성상세포에서의 자가포식 현상

간성상세포의 활성화 과정에서 보이는 특징 중의 하나는 레티닐 에스테르와 트리글리세라이드로 이루어져 있는 lipid droplet의 감소 현상이다. 최근에 라이소좀에 의한 분해를 통한 세포내 소기관 및 단백질을 재이용하는 세포 내 항상성을 유지하게 하는 필수적인 이화 과정인 자가포식 현상이 간성상세포의 활성화에 관여한다고 보고된 바 있다; 자가포식 현상은 간성상세포의 lipid droplet 분해를 통해 에너지를 공급하여 섬유화 반응을 유도한다 (Hernandez-Gea et al. 2012).

2. 자가포식현상의 메커니즘

이러한 자가포식 현상 과정은 각각 다른 단계를 매개하는 여러 단백질들에 의해 역동적으로 일어난다; 이 중 중요한 단계는 microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)의 분해가 LC3-I을 만들고 이것이 최종적으로 세포막에 결합된 LC3-II를 생성하게 하는 것이다. 이 결합체와 LC3-II의 결합은 세포막 연장 및 자가포식포를 형성하기 위한 세포막의 폐쇄에 필요한 과정이다. 이 단계는 ATG12-5과 ATG16이 상호작용하여 만들어진 결합체에 의해 이루어진다 (Kabeya et al. 2000). 이 과정을 부연하자면, ATG7과 ATG10이 ATG12의 ATG5와의 결합을 매개하게 되고 (Mizushima et al. 1998), 이 결합체는 ATG16과 상호 작용하게 된다 (Ohsumi and Mizushima 2004). 이 후 ATG 결합체는 세포막 구조와 상호 작용하게 되고 자가포식포로부터 분리된다. 이와는 다른 결합 반응도 존재하는데, 여기에는 ATG8 또는 LC3라 불리우는 분자가 관여하게 된다. ATG4는 LC3의 C-말단을 절단시켜 C-말단에 글라이신 잔기가 있는 LC3-I을 만들어낸다. 그 후, ATG7과 ATG3는 LC3-I의 지질막에 존재하는 포스파티딜에탄올아민과의 결합을 유도하여 LC3-II를 생성하게 된다 (Ichimura et al. 2000). LC3-II는 자가포식포의 세포내외의 막을 연결하여 세포막을 신장시키고 세포막의 폐쇄 반응을 일으키게 되며 자가포식포와 라이소좀의 융합 반응 후에 분해되게 된다.

3. 간성상세포 활성화 매개인자들과 자가포식 현상과의 관계

흥미롭게도, 간성상세포의 활성화 매개인자들은 자가포식 과정을 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 세포외 기질을 축적시키는 역할을 하는 transforming growth factor- β 1 (TGF β 1), 그리고 가장 강력한 간성상세포 분열인자인 platelet-derived growth factor (PDGF) 모두 자가포식 과정을 촉진시킨다 (Friedman 1993, Qi et al. 1999, Bataller and Brenner 2005, Zhao et al. 2008, Thoen et al. 2011, Suzuki, Kiyono and Miyazono 2010, Kiyono et al. 2009). 또한, 자가포식 과정은 $G\alpha_{12}$ 과 결합하는 GPCR들의 리간드인 Ang II, thrombin, S1P에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다 (Wang et al. 2013, Yadav et al. 2010, Hu et al. 2011, Chang et al. 2009). 그러나 간성상세포의 자가포식 현상에서 $G\alpha_{12}$ 의 영향에 관한 연구는 전혀 이루어지지 않은 상황이다.

I-4. 가설 및 연구 목표

간섬유화 및 간성상세포 활성화 조절 과정에서 $G\alpha_{12}$ 의 발현, 이의 분자적 조절 기전 및 자가포식 현상 활성화와의 관련성에 관한 연구가 부족한 실정이므로, 본 연구에서는 1) $G\alpha_{12}$ 가 간성상세포에서 발현의 변화가 있는지 관찰하고, 발현 변화가 있다면 이러한 변화가 간섬유화를 촉진시킬 것인지를 탐구하고, 2) $G\alpha_{12}$ 발현 증가가 매개된 간성상세포 활성화에서의 분자적 기전으로 특정 마이크로 RNA의 변화를 제시하고, 3) $G\alpha_{12}$ 의존적 간성상세포 활성화가 특정 자가포식 관련단백질을 조절하여 세포의 자가포식 현상을 활성화시키는지의 여부를 *in vivo* 및 *in vitro* 실험을 통하여 검증하고자 하였다.

본 연구는 간성상세포를 조절하는 $G\alpha_{12}$ 및 이와 연계된 분자들을 간섬유화의 새로운 치료 타겟으로 제시하고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

II-1. 시약 및 재료

G α_{12} , p62 및 Beclin1 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. ATG7, ATG12-5, 및 GFP를 인식할 수 있는 항체들은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)로부터 구매하였다. LC3B 항체는 MBL international corporation (Woburn, MA, USA)에서, ATG4B는 Abcam (Cambridge, MA, UK) 제품을 이용하였다. PAI-1 항체는 BD Bioscience (Becton Dickinson, Mountain View, CA)에서 구매하였다. α -SMA, β -actin를 인식하는 항체들, Chlroquine (CQ), 3-methyladenine (3-MA)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, GAPDH 항체는 AbFrontier (Seoul, South Korea)에서 구매하였으며, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit과 goat anti-mouse IgGs는 Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA)에서 공급받았다. SP-600125은 Calbiochem (Carlsbad, CA, USA)에서 구매하였다.

II-2. 인체 조직 시료

선행 연구에 활용하였던 간섬유화 환자의 간조직 시료를 이용하였다 (Kim et al. 2010). 간섬유화의 진행 단계에 따라 병리 조직학적 분류 기준에 의해 악성화 정도를 구분하였다. 즉, 경증 간섬유화 (Ishak 섬유화 점수 3 또는 그 이하, 20명) 또는 중증 간섬유화 (Ishak 섬유화 점수 4 ~ 6, 20명) 환자로

분류하였고, 실험 프로토콜은 헬싱키 선언의 윤리 가이드라인을 준수하였으며 IRB 승인을 획득하였다 (No. 1005/001-003).

II-3. 면역조직화학적 염색

간조직 검체를 10% formalin에 고정하여 제작한 파라핀 포매 조직을 4 μ m 두께로 박절하여 슬라이드에 표본을 부착하였고, $G\alpha_{12}$, α -SMA 또는 GFP 항체를 반응시켜 염색하였다.

II-4. 세포 배양

인간 무한증식 간성상세포주인 LX-2 세포는 Dr. S.L. Friedmann (Mount Sinai School of Medicine, NY, USA)으로부터 분양받았다. 일차 간성상세포는 기존에 보고된 방법에 의해 Sprague-Dawley (SD) 랫드 또는 C57BL/6 마우스로부터 분리하였다 (Koo et al. 2016). 휴지기 상태의 간성상세포는 0일 간 배양하였으며, 활성형의 간성상세포는 7일 또는 12일간 배양하여 획득하였다. 인간 배아섬유아세포인 HEK293A 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 세포주들은 5% CO₂가 공급되는 37°C의 배양기에서 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지에서 계대 배양하며 실험에 사용하였다.

II-5. 병리 동물모델

동물 실험은 서울대학교 동물실험 윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee)의 지침에 따라 시행하였다. 모든 실험 동물은 $55\pm 5\%$ 의 습도, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 온도 및 환기가 조절된 서울대학교 약대 실험 동물 연구동에서 2주 이상 사육하여 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 특별한 언급이 없는 한 물과 고형사료를 자유로이 공급하였다. 8주령의 웅성 SD 랫 (140-160g)을 일차 간성상세포 분리에 사용하였다 (Cho et al. 2010). 또다른 실험으로, 간섬유화 유도를 위해 사염화탄소 (CCl_4)를 모델을 도입하였다. 이 때 $\text{G}\alpha_{12}$ 결손 마우스를 사용하였으며, 이들의 생산은 기존에 확립된 방법을 이용하였다 (Gu et al. 2002). 만성 간경화 유도 모델의 방법을 간략하게 설명하자면, 야생 및 $\text{G}\alpha_{12}$ 결손 C57BL/6 마우스에 vehicle 또는 사염화탄소 (CCl_4 , 0.5 mg/kg)를 일주일에 2번씩 총 5주 동안 복강내주사 (intraperitoneal injection, i.p.)하였다. 마지막 CCl_4 투여 24시간 후 간을 채취하였다. 급성 독성 모델에서는 야생 및 $\text{G}\alpha_{12}$ 결손 마우스에 CCl_4 단회 투여를 시행하였다. 이 실험들은 모두 8주령된 마우스를 사용하였다. 이 모델에서 각 군의 단백질 발현을 비교하기 위하여, 채취한 간을 프로테아제 저해제 (Calbiochem)가 들어있는 시료용해완충액 (1% Triton X-100, 50 mM HEPES [pH 7.4], 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaF, 10 mM EDTA, and 10 mM sodium vanadate)에 용해하였다. 간조직의 mRNA는 Trizol (Invitrogen)을 사용하여 분리하였으며 이어 real-time polymerase chain reaction

(PCR) 반응을 통해 분석하였다.

II-6. 면역화학적 분석

Sodium dodecylsulfate (SDS)-polyacrylamide 젤 전기영동은 기확립된 방법에 따라 수행하였다 (Lee et al. 2012). 세포 추출액에서 얻은 단백질을 시료희석완충액 [63 mM Tris (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol 및 0.0013% bromophenolblue]에 희석하여 6~12%의 젤을 사용하여 전기영동한 후, nitrocellulose membrane에 단백질을 전이시켰다. 1차 항체로 반응시킨 후 2차 항체로 HRP-conjugated IgG를 한 시간 반응시키고 ECL chemiluminescence system (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 발색하였다. 세포 용해물은 기확립된 방법에 따라 만들어졌다 (Jung et al. 2014). 세포를 인산완충용액으로 세척한 후 3,000g에서 3분간 원심분리하여 얻어진 펠릿에 용해완충액을 넣는다. 용해물을 10,000g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 사용하기 전까지 -70°C에 보관한다. 이 후 정량 과정을 통해 동일한 양을 포함하는 단백질 시료를 만들어 6~12%의 젤을 사용하여 전기영동한 후, nitrocellulose membrane에 단백질을 전이시켰다. 1차 항체로 반응시킨 후 2차 항체로 HRP-conjugated IgG를 한 시간 반응시키고 ECL chemiluminescence system (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 발색하였다.

II-6. Total RNA 분리, RT-PCR 및 Real-time RT-PCR

TRIZOL을 사용하여 세포에서 추출한 총 RNA (100 µg)와 d(T)16 primer를 사용하여 역전사시켜 cDNA를 얻었다. 확보한 cDNA 및 Light Cycler DNA master SYBR green-I 키트 (Light-Cycler 2.0®, Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 제조사의 지시된 방법에 따라 Real-time PCR을 수행하였다. Lightcycler software 4.0 (Roche, Mannheim, Germany)을 사용하여 결과값을 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자의 상대적인 값으로 보정하였다. 또한 melting curve 분석을 통하여 증폭된 산물의 특이성을 확인하였다. cDNA 증폭을 위해 실험에 사용한 프라이머 (primer) 서열은 Table 1에 기재하였다. microRNA (miR)의 qRT-PCR는 제조사의 지시에 따라 miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen)를 사용하여 수행하였다. 모든 결과값은 Hs_RNU6B_2 miScript Primer Assay kit (Qiagen)에 포함된 U6 small RNA로 보정하였다. Primer 서열은 Table1에 기재하였다.

Table 1. RT-PCR에 사용된 primer 서열 리스트

| Target | Primer | Sequence |
|------------------------|--------|------------------------|
| Human Gα ₁₂ | F | CTCAAGGGCTCAAGGGTTCTT |
| | R | CAGGAACATCCCATGCTTCTC |
| Mouse Gα ₁₂ | F | TGCTTCGACGGCATCACA |
| | R | GAAGTGCTTCTTAATGCTCA |
| Rat Gα ₁₂ | F | TTGTAGACGCTCGGGACAAG |
| | R | GGGGAAGTAGTTCAGCTGGC |
| Mouse PAI-1 | F | GACACCCTCAGCATGTTCATC |
| | R | AGGGTTGCACTAAACATGTCAG |

| | | |
|---------------------|---|-------------------------|
| Mouse α -SMA | F | TCCTCCCTGGAGAAGAGCTAC |
| | R | TATAGGTGGTTTCGTGGATGC |
| Human ATG5 | F | GGGAAGCAGAACCATACTATTTG |
| | R | AAATGTACTGTGATGTTCCAAGG |
| Human ATG12 | F | TCTATGAGTGTTTTGGCAGTG |
| | R | ATCACATCTGTAAAGTCTCTTGC |
| Mouse GAPDH | F | TGCCCCCATGTTTGTGATG |
| | R | TGTGGTCATGAGCCCTTCC |
| Human GAPDH | F | GAAGGTGAAGGTCGGAGTC |
| | R | GAAGATGGTGATGGGATTTC |
| miR-15a | | TAGCAGCACATAATGGTTTGTG |
| miR-15b | | TAGCAGCACATCATGGTTTACA |
| miR-16 | | TAGCAGCACGTAAATATTGGCG |
| miR-195 | | TAGCAGCACAGAAATATTGGC |
| miR-424 | | CAGCAGCAATTCATGTTTTGAA |
| miR-497 | | CAGCAGCACACTGTGGTTTGT |
| miR-122 | | TGGAGTGTGACAATGGTGTTTG |

II-8. 타겟화된 유전자 전달 (Targeted gene delivery)

간성상세포 특이적으로 $G\alpha_{12}$ 를 인코딩하는 렌티바이러스를 만들기 위해, pCMV6-GFP, pCMV6- $G\alpha_{12}$ WT을 마우스 α -SMA 유전자 프로모터 벡터에 재조합하였다 (Koo et al. 2016). 이의 서열 삽입 여부를 서열 확인 과정을 통해 진행하였다. 바이러스 입자를 만들기 위해 HEK293T 세포에 플라스미드 및 packing 벡터를 함께 넣고 형질도입을 수행하였다. 간성상세포 특이적 유전자 전달을 위한 실험으로, C57BL/6 마우스에 100 μ L PBS 주사액에 1×10^7

바이러스 포함하는 양을 꼬리 정맥 내에 주사하였다. 이후 마우스에 5주간 CCl₄를 투여하고 검체를 채취하였다.

II-9. 형질도입 (Transfection)

활성형 돌연변이 $G\alpha_{12}$ ($G\alpha_{12}QL$, Q229L) 및 JNK1의 우성음성돌연변이(dominant negative-JNK1, DN-JNK1)를 인코딩하는 플라스미드들은 Dr. Dhanasekaran (The University of Oklahoma, OK) (Wadsworth et al. 1997)로부터 공여받았다. V5가 태깅된 JNK1 (V5-JNK1) 및 JNK2 (V5-JNK2) 플라스미드는 Dr. H.S. Choi (Chosun University, Gwangju, Korea)로부터 공여받았다 (Choi et al. 2009). 세포 배양 용기 (6 well 배양접시)의 50–70% 정도 배양된 세포에 FuGENE[®] HD (Roche, Nutley, NJ)를 사용하여 과발현 플라스미드 (1 μ g) 또는 과발현 플라스미드의 backbone 만을 가지는 플라스미드 (Mock-transfection)를 Eagle's minimum essential medium (MEM)에 넣어 3시간 동안 반응시켜 세포 내로 도입하였다. 이 후 형질도입 반응한 세포에 1% FBS를 포함하는 MEM 배지를 넣고 24시간 동안 배양시킨다. 필요에 따라 chloroquine (CQ)를 처리하여 12시간 반응시킨다. 한편, 세포들에 FuGENE[®] HD를 사용하여 제조사의 지침에 따라 100 nM의 miR-16 유사체 또는 miR-16 저해제를 일시적으로 도입하였다: miRIDIAN miRNA mimic control, hsa-miR-16 mimic, inhibitor control, 및 hairpin inhibitor hsa-miR-16는 Dharmacon (Dharmacon, Chicago, IL)에서 구매하였다.

II-10. $G\alpha_{12}$ 3'UTR 리포터 유전자 분석

Luc- $G\alpha_{12}$ -3'UTR (Product ID: HmiT007744-MT01)을 포함하는 리포터 유전자는 GeneCopoeia (Rockville, MD)에서 구매하였다. 이 플라스미드는 human $G\alpha_{12}$ 의 3'UTR이 firefly luciferase와 융합되어있고, firefly luciferase값을 보정해주는 *Renilla* luciferase가 동시에 존재하는 형태이다. 리포터 유전자 분석은 제조사에서 공급해준 방식대로 수행하였다. 간단히, 세포 배양 용기에서 50-70% 배양된 HEK293 세포를 MEM에서 FuGENE® HD를 이용하여 리포터 유전자와 마이크로RNA 저해제를 같이 형질도입하였다. 24시간의 형질도입 반응 후 firefly luciferase와 *Renilla* luciferase 활성을 dual luciferase assay kit (GeneCopoeia)를 사용하여 POLAR Star Omega plate reader (BMG LabTech) 기계에서 측정하였다. Firefly luciferase 활성은 *Renilla* luciferase 값으로 보정하였다.

II-11. 아데노바이러스를 이용한 $G\alpha_{12}$ QL 또는 mCherry-GFP-LC3 감염

Mouse $G\alpha_{12}$ QL (Q229L)을 인코딩하는 아데노바이러스는 Dr. P.J. Casey (Duke University Medical Center, Durham, NC)로부터 공여받았다. 세포에 아데노바이러스를 감염다중도 (multiplicity of infection) 50으로 10% FBS를 함유하는 DMEM에서 24시간 동안 감염시켰다. LacZ 또는 GFP를 발현하는 아데노바이러스를 대조군으로 사용하였다.

II-12. 유전자 발현 데이터 분석

National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 유전자 발현 옴니버스 (gene expression omnibus, GEO)로부터 유전자 발현 데이터를 획득하여 분석하였다 (accession numbers: GSE25097).

II-13. 공초점현미경 분석

LX-2 또는 일차마우스간성상세포를 아데노 mCherry-GFP-LC3B로 감염시킨 후 paraformaldehyde로 30분간 고정시킨다. 이 후 세포에 mounting 용액을 올려 커버글라스를 덮어 mounting 용액이 잘 붙는 시간을 둔다. 이 후 a laser-scanning confocal microscope (Leica TCS NT, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)로 현상을 관찰하였다.

II-14. 통계분석

면역화학적 분석의 경우, Scanning densitometry는 Image Scan & Analysis System (Alpha-Innotech Corporation, San Leandro, CA)을 사용하여 배경을 제외시킨 밴드 영역의 강도를 Adobe Photoshop CS5 software로 정량하였다. Paired Student's *t*-test로 그룹간 유의성을 평가하였다. 데이터는 산술평균 \pm S.E.M으로 표기하였으며 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 을 기준으로 하였다.

III. 연구 결과

Part I: 간섬유화 모델 및 간성상세포에서의 $G\alpha_{12}$ 의 발현 및 간섬유화 과정에서의 기능

1. 간조직 내에서의 $G\alpha$ 소단위체들의 발현 비교

먼저, 간조직 샘플에서 각 세포 유형별로 실시한 단백질체 분석 데이터를 활용하여 간 내의 여러 세포에서의 $G\alpha$ 소단위체들의 발현양을 비교분석하였다. 간섬유화에서 중요한 역할을 하는 간성상세포에는 $G\alpha_{12}$ 가 특히 많이 분포하는 경향을 보였다 (Figure 1). 이는 $G\alpha_{12}$ 가 간성상세포에 많이 분포함으로써 간의 병태생리에 중요한 역할을 할 수 있음을 추론해 볼 수 있다.

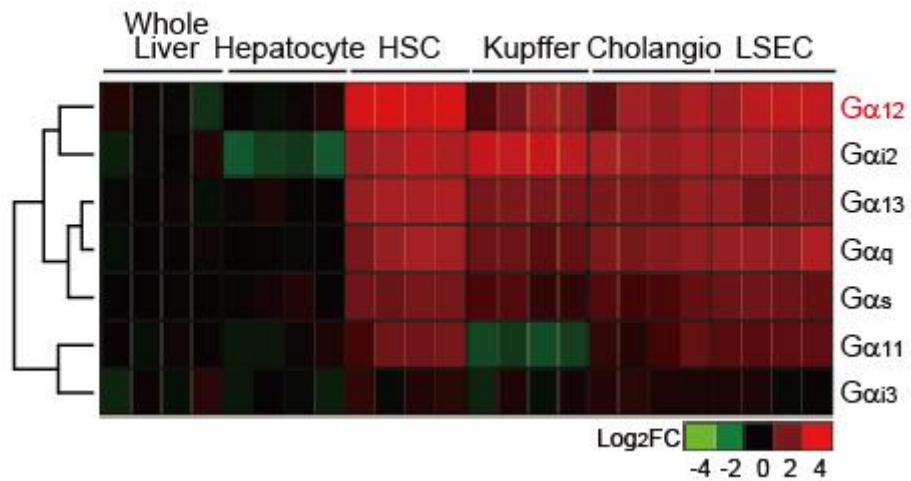


Figure 1. $G\alpha_{12}$ showed the highest signal intensities specifically in HSCs

Heat map of Gα-subunit proteins in the whole liver or individual hepatic cell types. Data were extracted from a cell-type-resolved proteomics atlas of the mouse liver. Protein levels in different types of liver-resident cells were normalized based on their expression in whole-liver homogenates

2. 간섬유화 동물 모델 및 활성화된 간성상세포에서 $G\alpha_{12}$ 의 발현 변화

간섬유화 진행 과정에서 $G\alpha_{12}$ 의 병태생리적 역할을 알아보기 위하여 간섬유화 동물 모델에서 $G\alpha_{12}$ 의 발현 변화를 관찰하였다. 사염화탄소 (CCl_4)를 체중 kg 당 0.5 mg으로 일주일에 2번씩 5주간 투여한 마우스에서 얻어진 간 조직에서 대조군에 비해 $G\alpha_{12}$ 의 발현이 증가되어 있었다 (Figure 2A, 왼쪽). 면역화학적 염색법으로 대조군과 간섬유화 동물 모델 간조직에서 $G\alpha_{12}$ 를 염색해보았을 때도 이러한 변화를 확인하였다. 이와 더불어, $G\alpha_{12}$ 와 대표적인 간성상세포 활성화 지표인 α -SMA의 염색된 형태가 간조직의 비슷한 부분에서 염색되었으며 (Figure 2A, 오른쪽), 이는 $G\alpha_{12}$ 가 활성화된 간성상세포에서 그 발현이 증가됨을 시사한다. 또한, $G\alpha_{12}$ 와 α -SMA 발현이 모두 배양에 의해 활성화된 간성상세포에서 증가됨이 관찰되었다 (Figure 2B). 이러한 결과들은 간성상세포에서 $G\alpha_{12}$ 의 발현 증가가 간성상세포 활성화를 촉진시키고, 이는 나아가 간섬유화를 유발 및 촉진시킬 수 있음을 지지한다.

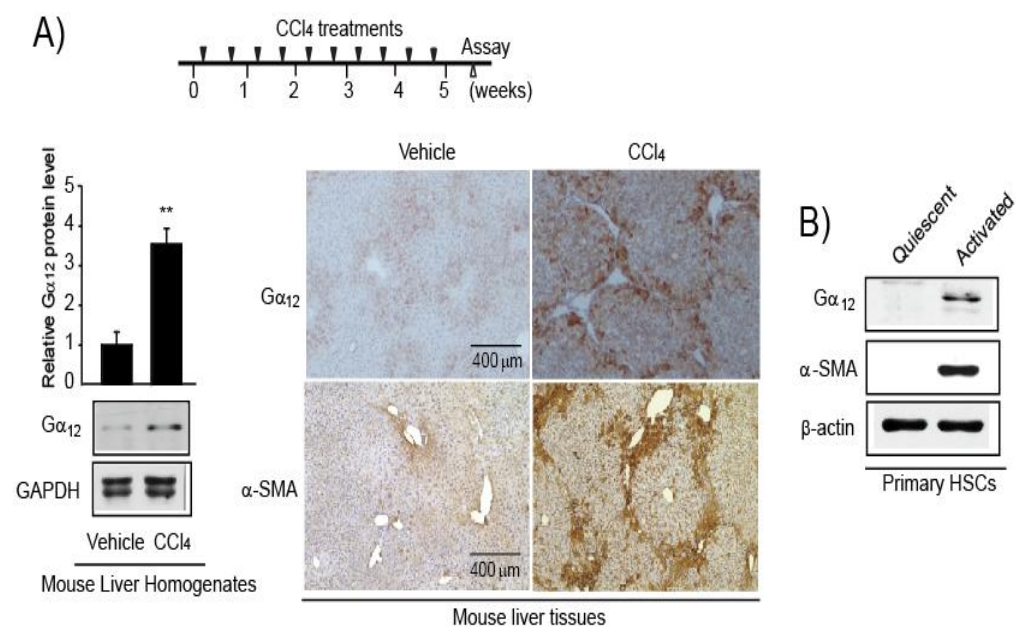


Figure 2. $G\alpha_{12}$ is overexpressed in activated HSCs and in fibrotic liver tissue

A) Left: immunoblotting for $G\alpha_{12}$. Mice were repetitively injected with vehicle (corn oil) or CCl₄ (0.5 mg/kg body weight, intraperitoneally, twice a week for 5 weeks; $n = 4-6$ each). GAPDH was used to assess equal protein loading. Right: representative photomicrographs of immunostaining for $G\alpha_{12}$ and α -SMA in liver samples (scale bar: 400 μ m).

B) Immunoblotting for $G\alpha_{12}$ in primary HSCs. Rat primary HSCs were cultured in growth medium for quiescent (freshly isolated) or activated (culture-activated) HSCs. α -SMA was used as a HSC-activation marker. β -actin was used to assess equal protein loading.

3. 간섬유화 동물 모델 및 활성화된 간성상세포에서 $G\alpha_{13}$ 의 발현 변화

다음으로, 다른 $G\alpha_{12}$ family인 $G\alpha_{13}$ 의 발현을 간섬유화 동물 모델에서 관찰하였다. $G\alpha_{12}$ 와는 다르게 $G\alpha_{13}$ 은 간섬유화 동물 모델에서 그 발현이 증가되지 않았다 (Figure 3A). 또한, 활성화된 간성상세포에서 $G\alpha_{13}$ 의 발현은 $G\alpha_{12}$ 의 발현 증가에 비해 약하였다 (Figure 3B). 이는 간성상세포의 활성화에 $G\alpha_{13}$ 보다는 $G\alpha_{12}$ 가 더 크게 기여함을 유추할 수 있다.

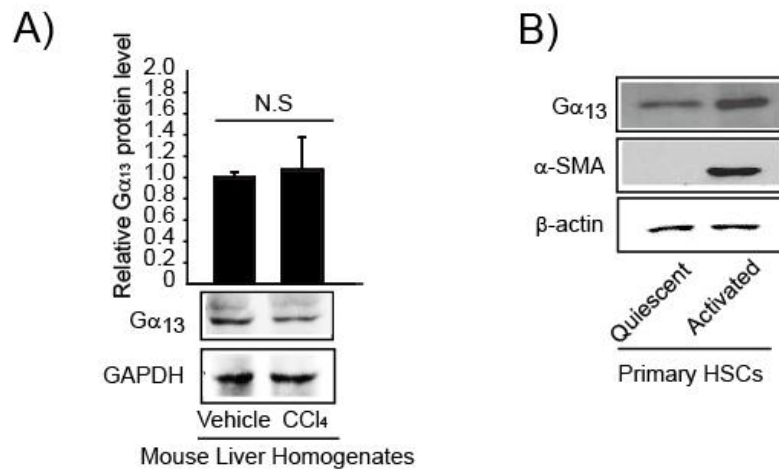


Figure 3. $G\alpha_{13}$ was not comparably induced in fibrotic liver samples and activated HSCs

A) Immunoblottings for $G\alpha_{13}$ in the liver homogenates prepared from mice treated as in the legend to Fig. 2. Data represent the mean \pm S.E.M. ($n = 4-6$ each). N.S., not significant

B) Immunoblottings for $G\alpha_{13}$ or in mouse quiescent or activated primary HSCs.

4. 인간 간섬유화 유전자 발현 데이터에서의 $G\alpha_{12}$ 패밀리와 결합하는 G 단백질 결합 수용체들의 발현 변화

이와 더불어 인간 간섬유화 유전자 발현 데이터를 분석하여 보았을 때, $G\alpha_{12}$ 패밀리와 결합하는 많은 G 단백질 결합 수용체들의 mRNA 양이 정상군에 비해 간섬유화 환자군에서 증가되어 있었다 (Figure 4). 종합할 때, 본 연구 결과는 $G\alpha_{12}$ 뿐만 아니라 이와 결합하는 수용체의 발현이 간섬유화에서 증가되어 있고, 이들이 간섬유화의 발병 및 진행에 어떠한 영향을 미칠 가능성을 제기한다.

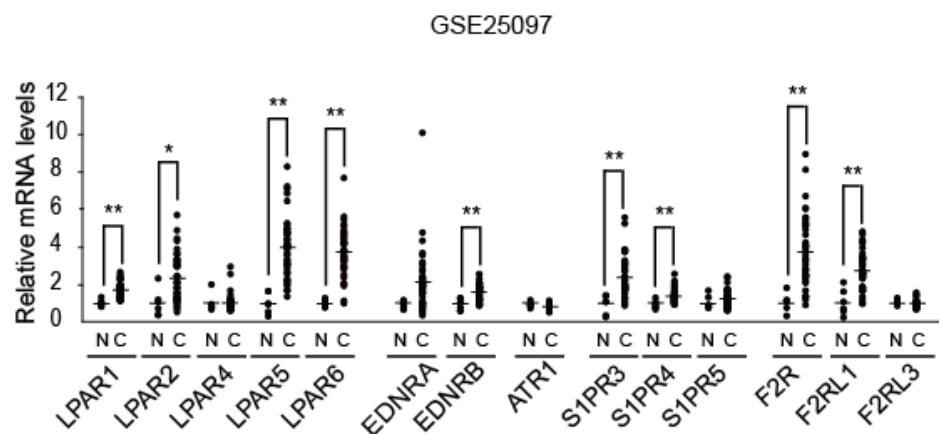


Figure 4. Transcript levels of representative GPCRs coupled to $G\alpha_{12}$ family members in patients with liver cirrhosis or healthy individuals (GSE25097) N: healthy individuals, C: liver cirrhosis patients

5. $G\alpha_{12}$ 결손에 의한 간섬유화 억제

$G\alpha_{12}$ 의 발현 증가가 간섬유화 및 간세포 손상에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 본 연구자는 야생형 (wild-type, WT) 및 $G\alpha_{12}$ 결손형 ($G\alpha_{12}$ knockout, KO) 마우스를 사용하여 5주간 CCl_4 를 투여한 간섬유화 모델을 도입하였다. Masson's trichrome 및 α -SMA 염색을 시행하였을 때, *Gna12* KO 마우스의 간조직에서 세포외기질의 축적이 대조군에 비해 현저하게 감소되어 있었다 (Figure 5A). 이러한 현상은 α -SMA와 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)의 mRNA 양을 real-time RT-PCR로 정량하였을 때도 동일한 현상이 관찰되었다 (Figure 5B). 본 연구 결과는 $G\alpha_{12}$ 를 억제할 때 반복적인 간독성 물질 투여로 인하여 생기는 간섬유화증을 억제하는 가능성을 제시한다.

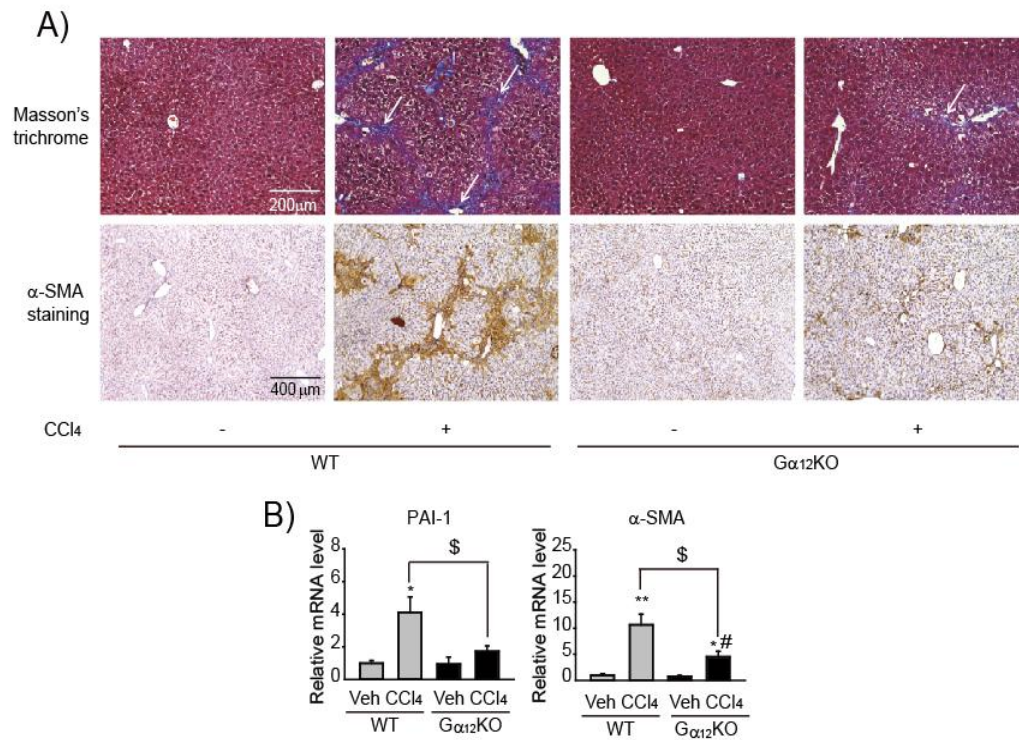


Figure 5. Liver fibrosis was inhibited by $G\alpha_{12}KO$

A) Upper: representative photomicrographs of collagen deposition. Mice were treated as described in the legend to Fig. 1B ($n = 4-6$ each). Paraffin-embedded sections from mice were stained with Masson's trichrome. White arrows indicate periportal fibrosis (scale bar: 200 μm). Lower: representative photomicrographs of immunostaining for α -SMA (scale bar: 400 μm).

B) Real-time RT-PCR assays for PAI-1 and α -SMA. GAPDH mRNA was used as a control. Data represent the mean \pm S.E.M. ($n = 4-6$ each). $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$,

significant versus vehicle-treated WT mice; $\#p < 0.05$ and $\#\#p < 0.01$, significant versus vehicle-treated $G\alpha_{12}$ KO mice; $\$p < 0.05$, significant versus CCl_4 -treated WT mice.

6. $G\alpha_{12}$ 결손에 의한 간손상 억제

*Gna12*의 결손은 간섬유화 억제 현상과 더불어 간세포 괴사와 염증 세포 침윤을 포함하는 조직학적 변화를 개선시키는 것으로 나타났다 (Figure 6A). HAI-Knodell scores, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) 및 lactate dehydrogenase (LDH) 수치들도 또한 *Gna12*의 결손에 의해 경감되었다 (Figure 6B and 6C). 이러한 결과들을 종합해 볼 때 $G\alpha_{12}$ 의 결손은 간독성 물질로 인한 간섬유화 뿐만 아니라 간손상도 억제시킴을 알 수 있었다.

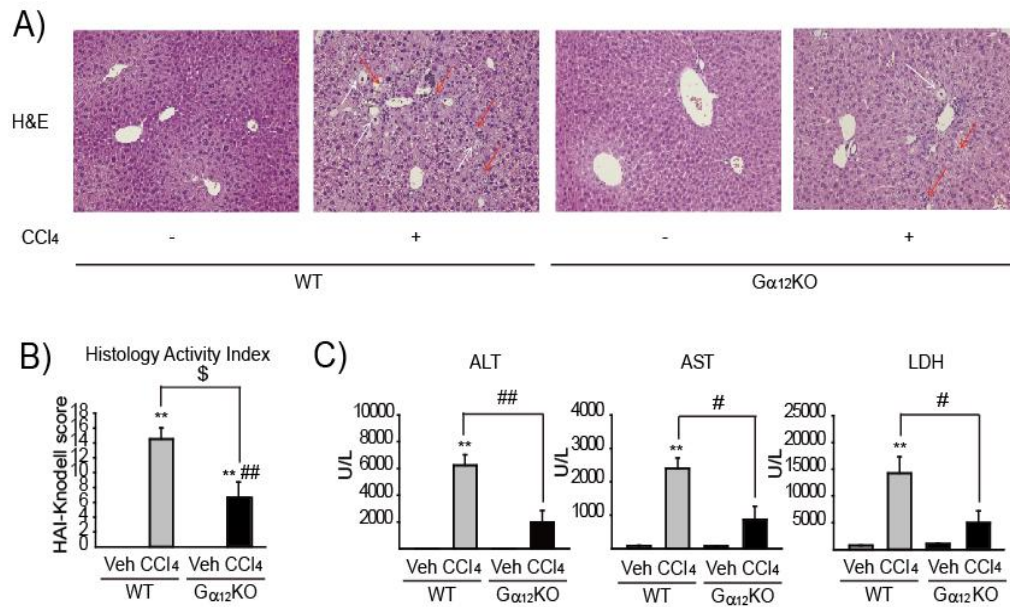


Figure 6. Liver injury was inhibited by Gα₁₂KO

A) Representative photomicrographs of liver histopathology. White arrows indicate vacuolar degeneration of hepatocytes, whereas red arrows show inflammatory cell infiltration in the periportal area (scale bar: 200 μm).

B) HAI-Knodell scores.

C) ALT, AST, and LDH activities in serum.

For B, and C, data represent the mean ± S.E.M. (*n* = 4–6 each). **p* < 0.05 and ***p* < 0.01, significant versus vehicle-treated WT mice; #*p* < 0.05 and ##*p* < 0.01, significant versus vehicle-treated Gα₁₂KO mice; \$*p* < 0.05, significant versus CCl₄-treated WT mice.

7. 간성상세포 특이적 $G\alpha_{12}$ 발현에 의한 간섬유화 증가

간성상세포에서의 $G\alpha_{12}$ 과발현으로 인한 효과를 검증하기 위하여, 본 연구자는 $G\alpha_{12}$ 를 간성상세포 특이적으로 발현할 수 있는 렌티바이러스 SMA- $G\alpha_{12}$ (LV-SMA- $G\alpha_{12}$) 시스템 (α -SMA 프로모터 하위에 $G\alpha_{12}$ 를 암호화하는 유전자를 가진 렌티바이러스)을 구축하였다 (Figure 7A, 왼쪽). 이 LV-SMA- $G\alpha_{12}$ 및 대조군 렌티바이러스를 야생형 또는 $G\alpha_{12}KO$ 마우스에 감염시키고 5주간 CCl_4 를 투여하였다. 면역조직화학적 염색법으로 GFP를 염색한 결과는 간성상세포 특이적으로 $G\alpha_{12}$ 가 발현됨을 확인할 수 있었다 (Figure 7A, 오른쪽). 흥미롭게도, 간성상세포 특이적 $G\alpha_{12}$ 의 발현은 간에서 *Gna12* 결손으로 인한 콜라겐 축적 억제 효과를 반전시켰다 (Figure 7B). 앞에서 시행한 간조직 샘플을 활용하여 면역화학적 분석법으로 PAI-1 및 α -SMA를 정량해 보았을 때도 동일한 결과를 얻을 수 있었다 (Figure 7C). 이러한 연구 결과는 간성상세포 특이적 $G\alpha_{12}$ 발현이 간섬유화 현상을 촉진시킴을 지지한다.

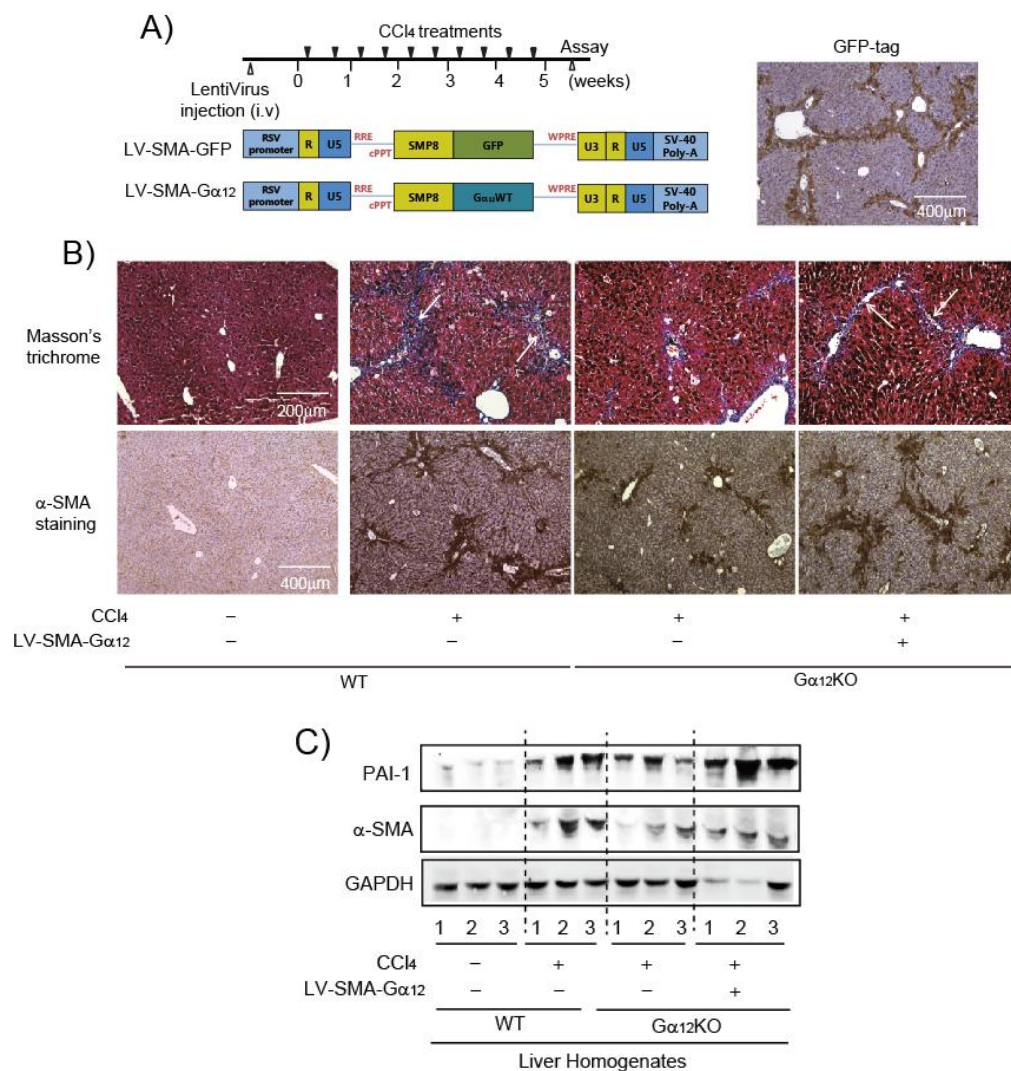


Figure 7. HSC-specific lentiviral delivery of $G\alpha_{12}$ exacerbated liver fibrosis

A) Schematic showing lentiviral constructs encoding GFP (LV-SMA-GFP) or WT- $G\alpha_{12}$ (LV-SMA- $G\alpha_{12}$) downstream of the mouse α -*sma* promoter (SMP8). Liver sections were immunostained for GFP to verify HSC-specific delivery of target gene (scale bar:

400 μ m). Mice were injected with each construct (or vehicle) through the tail vein. After 1 week, mice were subjected to CCl₄ treatment for 5 weeks ($n = 3-9$ each).

B) Upper: representative photomicrographs of Masson's trichrome staining of liver sections. White arrows indicate periportal fibrosis (scale bar: 200 μ m). Liver tissues of vehicle-alone group were stained separately. Lower: representative photomicrographs of immunostaining for α -SMA (scale bar: 400 μ m). Liver tissues of vehicle-alone group were stained separately.

C) Immunoblots for PAI-1 and α -SMA in liver homogenates.

8. 간성상세포 특이적 $G\alpha_{12}$ 발현이 간손상에 미치는 영향

간성상세포 특이적 $G\alpha_{12}$ 발현이 간손상에 미치는 영향을 살펴보았을 때, 야생형 마우스의 간조직에서 관찰되는 간세포의 공기가 주입된 형태의 변성 및 괴사, 염증세포의 침윤 현상이 $G\alpha_{12}$ 결손 마우스에서 호전된 상태를 보였고, 간성상세포 특이적 $G\alpha_{12}$ 발현은 이러한 호전 현상을 반전시켰다 (Figure 8A). 이러한 변화는 HAI-Knodell score로도 확인할 수 있었다 (Figure 8B). ALT, AST 및 LDH의 변화도 통계학적 유의성은 부족하지만 비슷한 경향을 보였다 (Figure 8C). 이러한 결과들은 간성상세포특이적 $G\alpha_{12}$ 발현이 간손상도 촉진하는 경향이 있음을 보여준다.

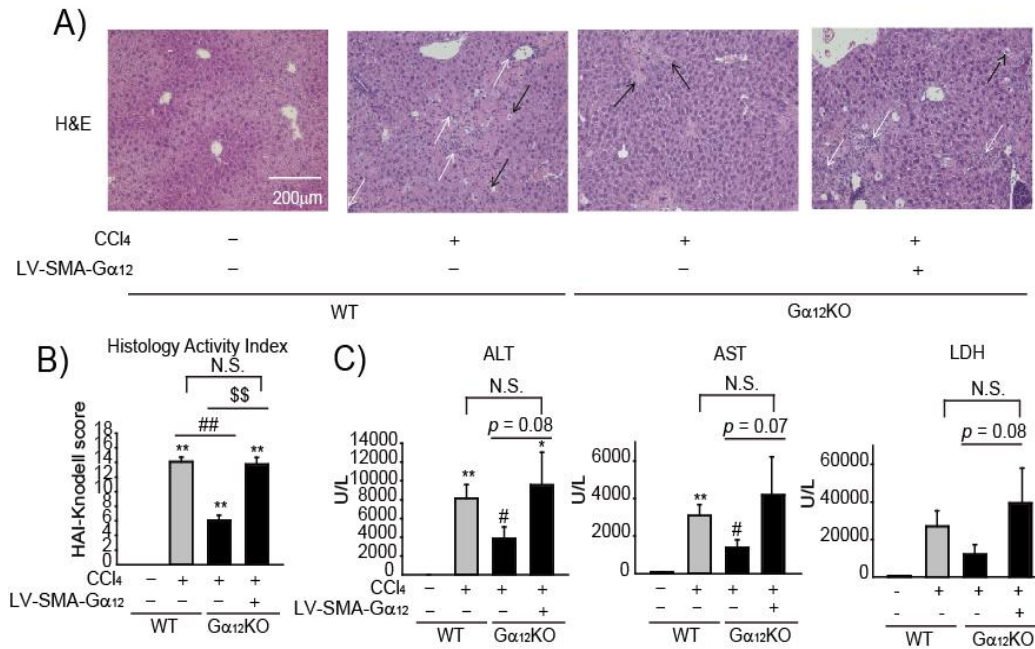


Figure 8. HSC-specific lentiviral delivery of Gα₁₂ tended to aggravate liver injury

A) Representative photomicrographs of hematoxylin and eosin staining. Black arrows indicate ballooning degeneration of hepatocytes, whereas white ones show infiltration of inflammatory cells and piecemeal necrosis of hepatocytes (scale bar: 200 μm). Liver tissues of vehicle-alone group were stained separately.

B) HAI-Knodell scores.

C) ALT, AST, and LDH activities in serum.

For B and C, data represent the mean ± S.E.M. (*n* = 3–9 each). ***p* < 0.01, significant versus vehicle-treated WT mice; #*p* < 0.05 and ##*p* < 0.01, significant versus CCl₄-

treated WT mice injected with LV-SMA-GFP; and $p < 0.01$, significant versus CCl₄-treated Gα₁₂ KO mice injected with LV-SMA-GFP.

Part II: $G\alpha_{12}$ 의 발현 조절 메커니즘

1. 활성화된 간성상세포 및 간섬유화 동물 모델에서 $G\alpha_{12}$ 의 mRNA 발현 관찰

$G\alpha_{12}$ 발현 증가를 유도하는 분자적 메커니즘을 규명하기 위하여, 본 연구자는 먼저 $G\alpha_{12}$ 의 mRNA 양을 측정하였다. 그 결과 활성화된 간성상세포에서 $G\alpha_{12}$ 의 mRNA 양이 증가하지 않음을 발견하였다 (Figure 9A). 이와 같은 결과는 동물 간섬유화 모델 및 인간 간경화 집단의 간조직 샘플에서도 확인되었다 (Figure 9B and 9C). 따라서, $G\alpha_{12}$ 의 발현은 전사후과정을 통해 조절될 가능성을 제기한다.

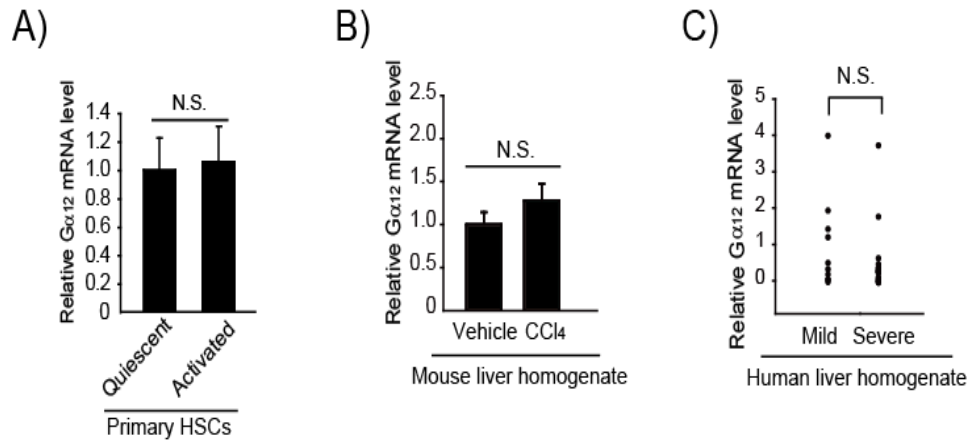


Figure 9. $G\alpha_{12}$ was post-transcriptionally regulated

A) Real-time RT-PCR assay for $G\alpha_{12}$ in rat quiescent or activated primary HSCs.

B) Real-time RT-PCR assays for $G\alpha_{12}$ in the liver samples prepared from mice treated with CCl₄ (0.5 mg/kg body weight, twice a week, for 5 weeks, $n = 3-6$ each)

C) Real-time RT-PCR assays for $G\alpha_{12}$ in the liver samples from patients with mild fibrosis or severe fibrosis (Ishak scores, 0-3 vs. 4-6, $n = 10, 21$ each)

For A-C, data represent the mean \pm S.E.M. N.S., not significant.

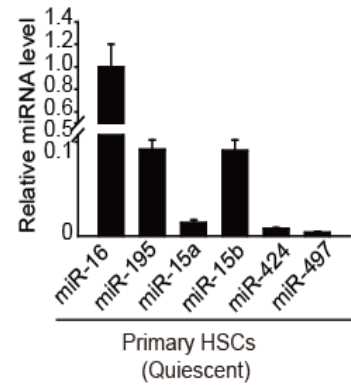
2. $G\alpha_{12}$ 의 발현의 새로운 조절자 miR-16의 도출

타겟 단백질의 전사후 과정을 조절하는 주요한 메커니즘으로 거론되는 것이 마이크로 RNA이다. $G\alpha_{12}$ 발현이 마이크로 RNA에 의해 조절받는지 검증하기 위하여, 본 연구자는 TargetScan 5.2 알고리즘을 이용하여 $G\alpha_{12}$ 를 타겟팅하는 마이크로 RNA 후보들을 도출하였고, MiRNA.org 사이트를 활용하여 mirSVR scores를 계산하여 타겟팅하는 가능성을 비교해 보았다. 이들 중, miR-16은 후보 마이크로 RNA들 중 가장 높은 확률로 $G\alpha_{12}$ 를 타겟팅 마이크로RNA 중 하나로 예측되었고 (Figure 10A), 휴지기 상태의 간성상세포에서 그 양이 가장 많았다 (Figure 10B). 이와 함께, miR-16은 간세포보다 휴지기 상태의 간성상세포에 더 많이 분포하는 것으로 나타났다. 반면에, 간세포에 많이 발현하는 것으로 이미 알려진 miR-122의 발현은 휴지기 상태의 간성상세포보다 간세포에 많이 분포하였다 (Figure 10C). 흥미롭게도, miR-16의 발현은 활성화된 간성상세포에서 현저히 감소되어 있었다 (Figure 10D). 이 결과들로 미루어 보아 miR-16의 감소와 간성상세포 활성화가 서로 관련성이 있음을 알 수 있다.

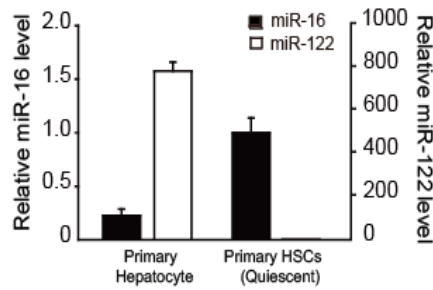
A)

| Putative $G\alpha_{12}$ -targeting miRs | |
|---|--|
| microRNA | Ranking of miRs by sum of mirSVR Score |
| miR-16 | 1 |
| miR-195 | 1 |
| miR-15a | 3 |
| miR-15b | 4 |
| miR-424 | 4 |
| miR-497 | 6 |
| Targetscan5.2 | microRNA.org |

B)



C)



D)

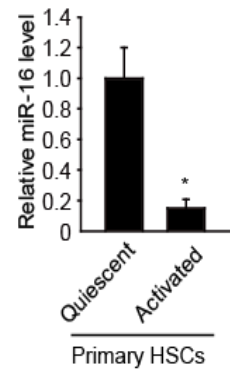


Figure 10. miR-16 was dysregulated during HSC activation

A) miRs putatively targeting $G\alpha_{12}$. Indicated miRs were predicted to target $G\alpha_{12}$ according to TargetScan (Release 5.2), and the candidate miRs were ranked by the sum of mirSVR scores obtained using microRNA algorithm.

B) Real-time RT-PCR assays for the candidate miRs in quiescent rat primary HSCs. Data were normalized against the levels of U6 small RNA.

C) Real-time RT-PCR assays for miR-16 or miR-122 in rat primary hepatocytes or in rat quiescent primary HSCs.

D) Real-time RT-PCR assays for miR-16 in rat quiescent or activated primary HSCs.

For B–D, data represent the mean \pm S.E.M ($n = 3-4$ each). $*p < 0.05$, significant compared with quiescent primary HSCs.

3. 간성상세포에서 $G\alpha_{12}$ 의 발현 조절자로 예측된 다른 마이크로 RNA의 발현 관찰

이와 더불어 miR-16와 동일하거나 유사한 seed sequence를 지니며 $G\alpha_{12}$ 발현을 조절하는 것으로 예측되는 다른 마이크로 RNA들의 발현양을 간성상세포 샘플에서 관찰하였다. 이들 마이크로 RNA들의 발현양 또한 간성상세포 활성화 과정에서 감소하는 것으로 관찰되었다 (Figure 11).

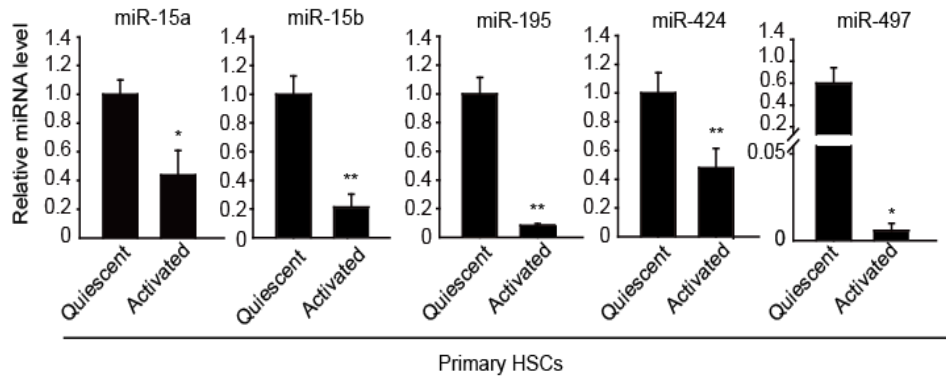


Figure 11. Other predicted miRs were also downregulated during HSC activation

Real-time RT-PCR assays for the microRNAs putatively targeting $G\alpha_{12}$ in rat quiescent or activated primary HSCs. Data represent the mean \pm S.E.M. ($n = 3$ each); * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, significant as compared with quiescent HSCs.

4. 간섬유화 동물 모델 및 인간 섬유화 조직에서 miR-16 변화

miR-16의 이상 발현이 실제 간섬유화 모델에서도 일어나는지를 살펴보기 위하여 간섬유화 동물 모델 및 인간 섬유화 조직 샘플에서 miR-16의 양을 정량하였다. 그 결과, miR-16의 양은 각 샘플의 대조군에 비하여 현저히 감소되어 있었다 (Figure 12).

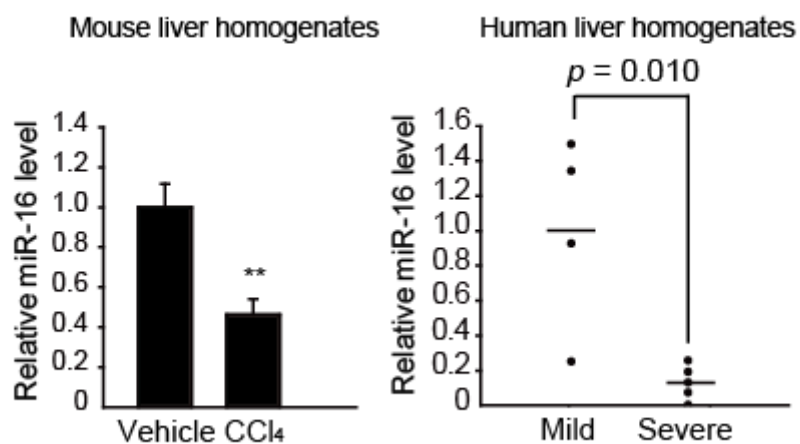


Figure 12. Dysregulation of miR-16 was observed in liver tissues from fibrotic animal model and patients

Left: Real-time RT-PCR assays for miR-16 in liver samples from mice treated with CCl₄ for 5 weeks. Data represent the mean \pm S.E.M. ($n = 3-4$ each). ** $p < 0.01$, significant as compared with vehicle-treated control. Right: in the liver sections of patients with mild fibrosis or severe fibrosis (Ishak scores: 0–3 vs. 4–6; right). Means are indicated. Statistical analysis was performed using Students's t -test ($n = 4-5$ each).

5. miR-16에 의한 $G\alpha_{12}$ 의 직접적 발현 억제

miR-16이 $G\alpha_{12}$ 의 생합성 (즉, 단백질 번역)을 직접적으로 억제하는지를 알아보기 위하여, 본 연구자는 miR-16의 서열과 $G\alpha_{12}$ 3'-UTR 간의 페어링을 비교해 보았다. 그 결과, 두 서열은 거의 완벽한 상보성을 지니는 것으로 밝혀졌다. 이와 더불어, $G\alpha_{12}$ mRNA의 3'-UTR 내에 존재하는 miR-16을 인지하는 부위들이 다양한 종에서 잘 보존되어 있음을 발견하였다 (Figure 13A). miR-16의 $G\alpha_{12}$ 발현 억제는 miR-16의 발현을 조절하는 miR-16 저해제와 유사체를 사용하여 관찰한 $G\alpha_{12}$ 의 발현 관찰 실험을 통해 증명되었다 (Figure 13B). 또한, miR-16 저해제의 형질도입은 HEK293A세포에서 Luciferase- $G\alpha_{12}$ -3'-UTR construct의 luciferase 활성을 증가시켰다 (Figure 13C). 이러한 결과들을 종합해 볼 때 활성화된 간성상세포에서의 miR-16의 발현 저하는 $G\alpha_{12}$ 의 발현을 증가시킴을 알 수 있다.

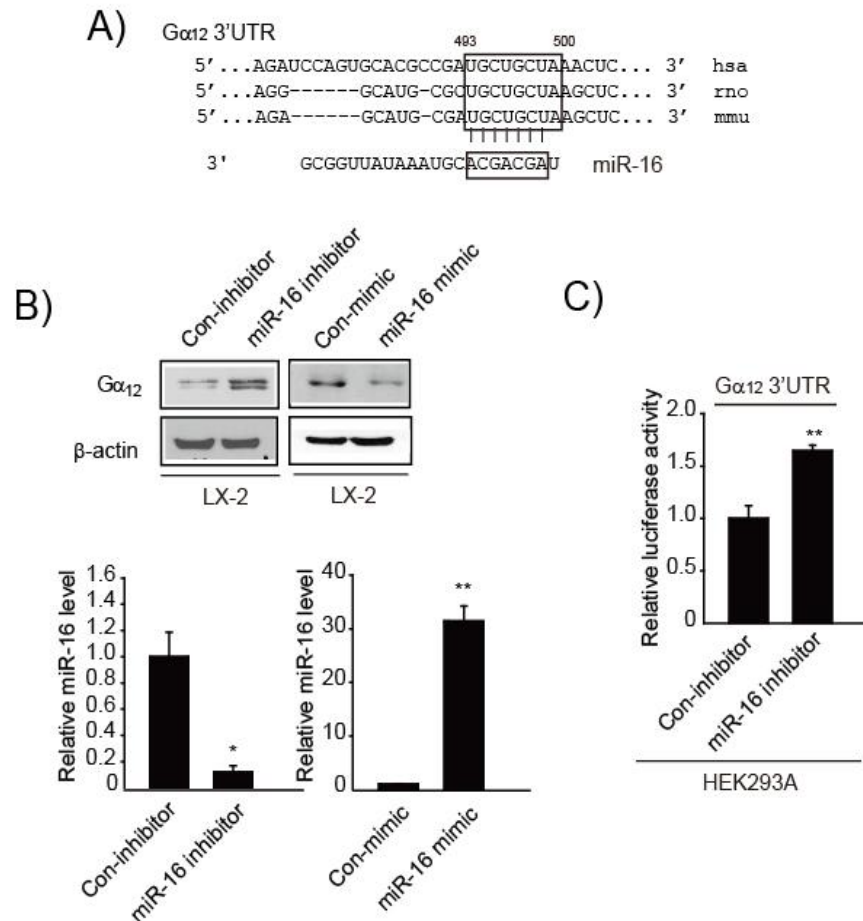


Figure 13. miR-16 directly inhibited $G\alpha_{12}$

A) Alignments of miR-16 binding to the 3'-UTRs of $G\alpha_{12}$ mRNAs in different species.

B) Upper: immunoblots for $G\alpha_{12}$ in LX-2 cells transfected with miR-16 inhibitor, miR-16 mimic, or their respective controls for 72 h. Lower: Real-time RT-PCR for miR-16.

C) 3'-UTR reporter assays. HEK293A cells were transfected with miR-16 inhibitor or its control in combination with a $G\alpha_{12}$ 3'-UTR-reporter construct.

For B and C, data represent the mean \pm S.E.M. ($n = 3-6$ each). $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$, significant as compared with respective controls.

Part III: 증가된 $G\alpha_{12}$ 에 의해 유도된 자가포식 현상

1. $G\alpha_{12}$ 에 의한 간성상세포의 자가포식 현상 활성화

자가포식 현상은 간성상세포의 활성화와 관계가 있으며 이는 곧 간섬유화 현상을 유발함이 보고되었다 (Hernandez-Gea et al. 2012, Thoen et al. 2011). 본 연구자는 $G\alpha_{12}$ 발현 증가가 이러한 자가포식 현상을 유도할 것이라는 가설을 세우고 이를 검증하고자 하였다.

기존에 보고된 바와 같이, 일차 간성상세포의 배양은 자가포식 현상을 활성화시킴을 자가포식 현상의 특이적 마커로 알려진 LC3B-II의 발현 증가를 통해 확인하였다 (Figure 14A). 반면 $G\alpha_{12}$ 의 결손은 거의 완벽하게 LC3B-II의 축적을 억제하였다 (Figure 14B). 이와 함께, *Gna12* 결손에 의해서 자가포식 현상의 유동 현상이 감소됨을 면역형광분석법을 통하여 관찰하였다. 이 분석법에서는 초록색 형광인 GFP는 산성인 라이소솜에서 분해되지만 빨간색 형광을 띄는 mCherry는 유지되는 성질을 이용하여 LC3 유동을 측정할 수 있는 아테노바이러스 mCherry-GFP-LC3를 사용한다 (이 때 GFP와 RFP가 합쳐져서 보이는 노란 형광점이 자가포식소체이고, RFP 형광만 보이는 점이 자가용해소체이다 (Levine and Klionsky 2004)). 그 결과, *Gna12* 결손 마우스에서 얻은 일차성상세포에서의 mCherry 형광점들이 야생형 마우스에서 얻은 컨트롤군과 대조해보았을 때 현저히 감소되어 있음을 발견하였다 (Figure 14C). 이와 같은 맥락으로, $G\alpha_{12}$ 의 활성형 돌연변이인 $G\alpha_{12}QL$ 을

과발현시킨 LX-2 세포에서는 LC3B-II 양이 증가하였다 (Figure 14D). 이와 더불어 자가포식 현상의 약물학적 저해제인 3-methyladenine을 처리하였을 때, 앞서 기술한 $G\alpha_{12}QL$ 에 의한 LC3B-II 축적이 저해되었다 (Figure 14E). 따라서, 이러한 발견들은 $G\alpha_{12}$ 가 자가포식 현상을 촉진시킴을 암시한다.

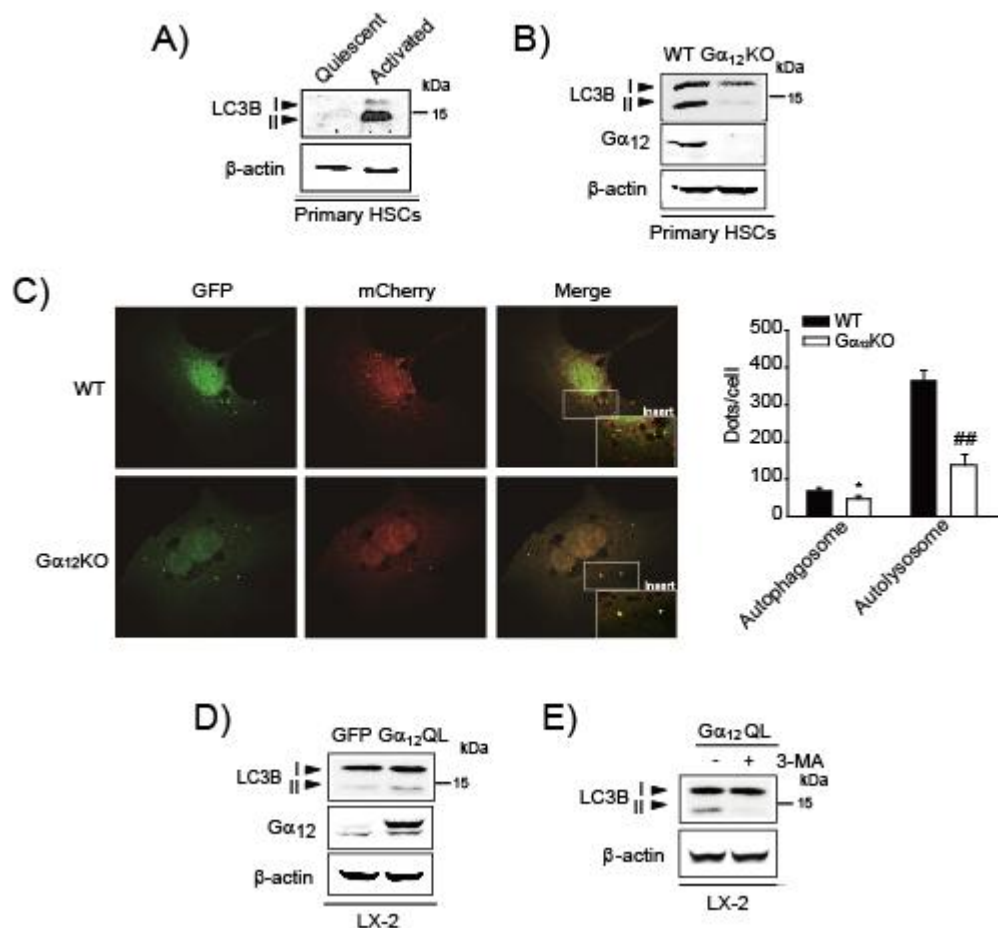


Figure 14. $G\alpha_{12}$ activated autophagy in HSCs

A) Immunoblots for LC3B-I and LC3B-II in mouse primary HSCs. Quiescent or activated HSCs were treated with 10 μ M chloroquine (CQ) for 12 h.

B) Immunoblots for LC3B-I/II in primary HSCs isolated from WT mice or $G\alpha_{12}$ KO mice treated with a single dose of CCl_4 (0.5 mg/kg) for 48 h. Mouse HSCs were cultured in a growth medium for 5 days. Immunoblots confirmed *Gna12* knockout.

C) Representative photomicrographs of immunostaining for mCherry/GFP-LC3B puncta. Primary HSCs isolated from WT or $G\alpha_{12}$ KO mice treated with CCl_4 were cultured in growth medium for 5 days and infected with ad-mCherry-GFP-LC3 for 24 h. Confocal images of yellow (autophagosomes) or red (autolysosome) puncta were collected following adenoviral infection (magnification: $60\times$). Data represent the mean \pm S.E.M (n=3 each); * $p<0.05$, significant compared with yellow punctae of primary HSCs from WT mice; and ### $p<0.01$, significant compared with red only punctae of primary HSCs from WT mice.

D) Immunoblots for LC3B-I/II in LX-2 cells infected with ad- $G\alpha_{12}QL$ for 24 h. Immunoblots confirmed $G\alpha_{12}$ overexpression.

E) Immunoblots for LC3B-I/II in LX-2 cells treated with 5 μ M 3-MA (or vehicle) and CQ for 12 h following infection with ad- $G\alpha_{12}QL$ for 24 h.

2. $G\alpha_{12}$ 에 의한 간성상세포 자가포식 현상 유도 상황에서의 자가포식 현상 관련 단백 및 간성상세포 활성화 지표

앞서 밝힌 $G\alpha_{12}$ 에 의한 자가포식 현상 유도와 함께 $G\alpha_{12}$ 에 의한 간성상세포 활성화에의 영향을 살펴보기 위하여 본 연구자는 PAI-1 그리고/또는 α -SMA의 발현양을 면역화학법으로 분석하였다. 그 결과, $G\alpha_{12}$ 의 양에 의존적으로 PAI-1 및 α -SMA의 발현양이 변화함을 발견하였다 (Figure 15A and 15B). 이를 통해 $G\alpha_{12}$ 에 의해 자가포식 현상 유도가 일어날 뿐 아니라 간성상세포 활성화가 촉진됨을 확인할 수 있었다.

다음으로, $G\alpha_{12}$ 에 의한 자가포식 현상 유도의 분자적 기전을 밝히고자 하였다. 본 연구자는 ATG12-5 양이 *Gna12* 결손 일차간성상세포에서 현저하게 감소되어 있음을 발견하였다 (Figure 15A). 이와 반대로 LX-2 세포에 $G\alpha_{12}QL$ 를 감염시켰을 때 ATG12-5 양이 증가하였다. 반면에 Beclin1, ATG4B 및 ATG7의 발현에는 크게 차이가 없었다 (Figure 15B). 부가적으로, real-time RT-PCR 방법으로 ATG5와 ATG12의 mRNA양을 측정하여 보았을 때에는 큰 변화가 없었다 (Figure 15C). 앞서 사용한 $G\alpha_{12}$ 결손형 마우스에 간성상세포 특이적으로 $G\alpha_{12}$ 를 발현시킨 마우스의 간조직을 활용하여 LC3B-II와 ATG12-5의 양을 면역화학법으로 관찰해보았을 때 $G\alpha_{12}$ 의 발현이 컨트롤 바이러스를 주입한 $G\alpha_{12}$ 결손형 마우스의 간조직 샘플에서의 LC3B-II와 ATG12-5양이 경미하게 증가함을 발견하였다 (Figure 15D).

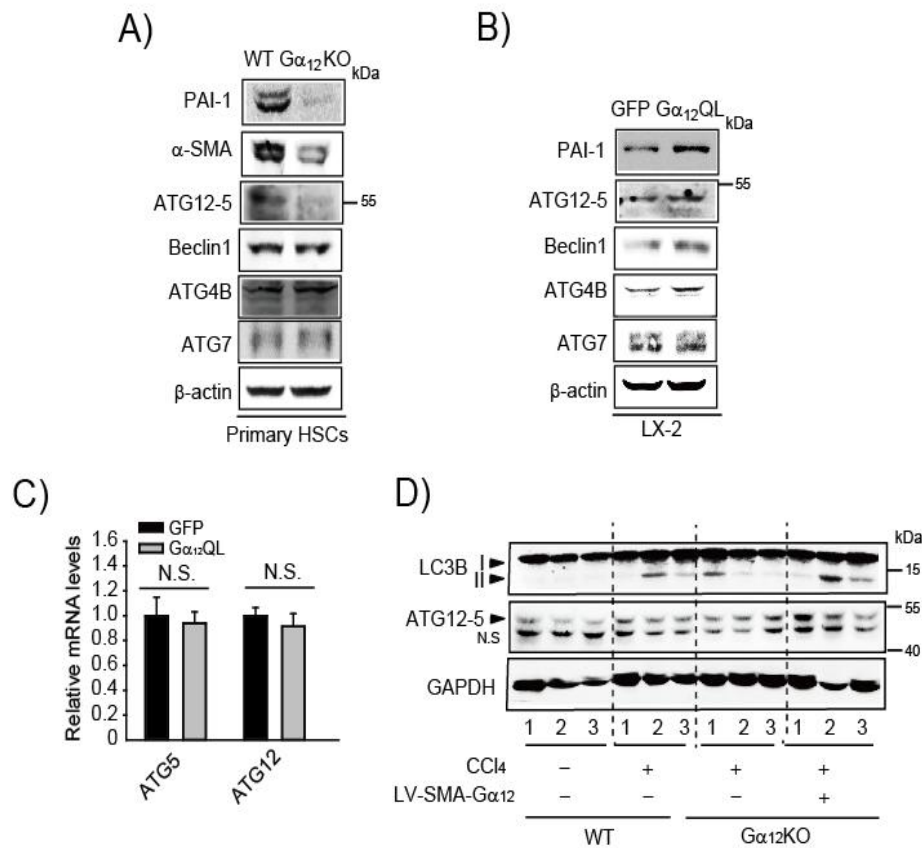


Figure 15. Changes of HSC activation and autophagy markers with $G\alpha_{12}$ modulation

A) Immunoblots for HSC activation and autophagy markers in primary HSCs isolated from WT or $G\alpha_{12}$ KO mice.

B) Immunoblots for HSC activation and autophagy markers in LX-2 cells infected with ad- $G\alpha_{12}$ QL.

C) Real-time RT-PCR assays for ATG5 or ATG12 in LX-2 cells infected with an adenoviral construct of GFP or $G\alpha_{12}$ QL for 24 h. Data represent the mean \pm S.E.M. ($n =$

4 each). N.S., not significant

D) Immunoblots for LC3B-I/II and ATG12-5 in liver homogenates prepared from animals treated as described in the legend to Figure 7A. (n.s., non-specific band).

3. $G\alpha_{12}$ 에 의한 자가포식 현상 유도 과정 중 ATG12-5 발현 변화에서 JNK의 역할

기존에 본 연구팀에서는 염증 신호 유도 및 암세포 바이올로지에 있어서의 JNK 의존적인 $G\alpha_{12}$ 의 역할들에 관하여 보고한 바 있다 (Jung et al. 2014, Kang et al. 2003, Ki et al. 2007). 따라서, 본 연구자는 $G\alpha_{12}$ 에 의한 자가포식 현상 활성화에서의 JNK의 역할을 ATG12-5 중합 반응과 연관시켜 밝혀보고자 하였다. JNK1 또는 JNK2의 과발현은 LX-2 세포에서 ATG12-5 및 LC3B-II의 양을 증가시킨 반면 (Figure 16A), 우성 음성형 돌연변이 벡터 또는 화학적 저해제인 SP-600125를 사용하여 JNK의 활성을 저해시켰을 때 $G\alpha_{12}QL$ 의 ATG12-5 및 LC3B-II 증가 효과를 무력화시켰다 (Figure 16B). 이는 JNK가 ATG12-5 형성을 조절함으로써 자가포식 현상 활성화를 유도함을 암시한다. 연구 결과를 종합하여 볼 때, 간성상세포에서의 $G\alpha_{12}$ 발현 증가는 JNK 의존적 ATG12-5의 형성을 촉진시킴으로써 자가포식 현상을 유도함을 시사한다.

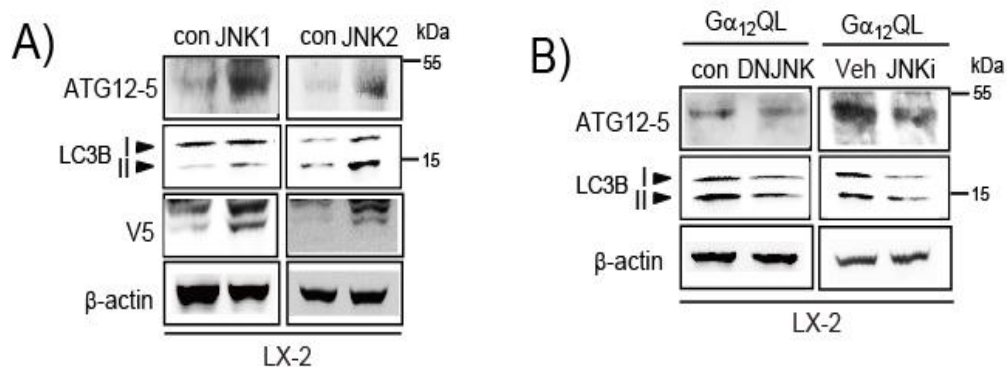


Figure 16. $G\alpha_{12}$ activated autophagy in HSCs via ATG12-5 formation in a JNK1/2-dependent manner

A) Immunoblots for ATG12-5 and LC3B-I/II in LX-2 cells transfected with V5-JNK1 or V5-JNK2. Immunoblots for V5 confirmed JNK1 or JNK2 overexpression.

B) Immunoblots for ATG12-5 and LC3B-I/II in LX-2 cells transfected with Gα₁₂QL in combination with DNJNK (or MOCK) for 24 h or in those treated with vehicle or SP600125 (10 μM) for 12 h following transfection with Gα₁₂QL for 24 h.

4. miR-16 발현 변화가 자가포식 현상에 미치는 효과

다음으로 본 연구자는 자가포식 현상에 있어서의 miR-16의 역할을 탐구해보고자 하였다. 먼저, 면역형광법으로 자가포식현상 유동 현상을 관찰하여 보았을 때 miR-16 저해제의 형질도입은 LX-2 세포에서 자가포식현상 유동을 증가시켰다 (Figure 17A). 또한, miR-16 저해제 형질도입은 LC3B-II 축적을 촉진시킴이 관찰되었다. miR-16의 발현 변화는 LC3B-II의 발현 변화 패턴과 동일한 패턴으로 PAI-1의 발현양을 변화시켰다 (Figure 17B). 이상의 결과를 바탕으로 하여 볼 때, 간성상세포에서 miR-16의 자가포식 현상에서의 역할 및 간섬유화에의 영향을 살펴볼 수 있었다 (Figure 17C).

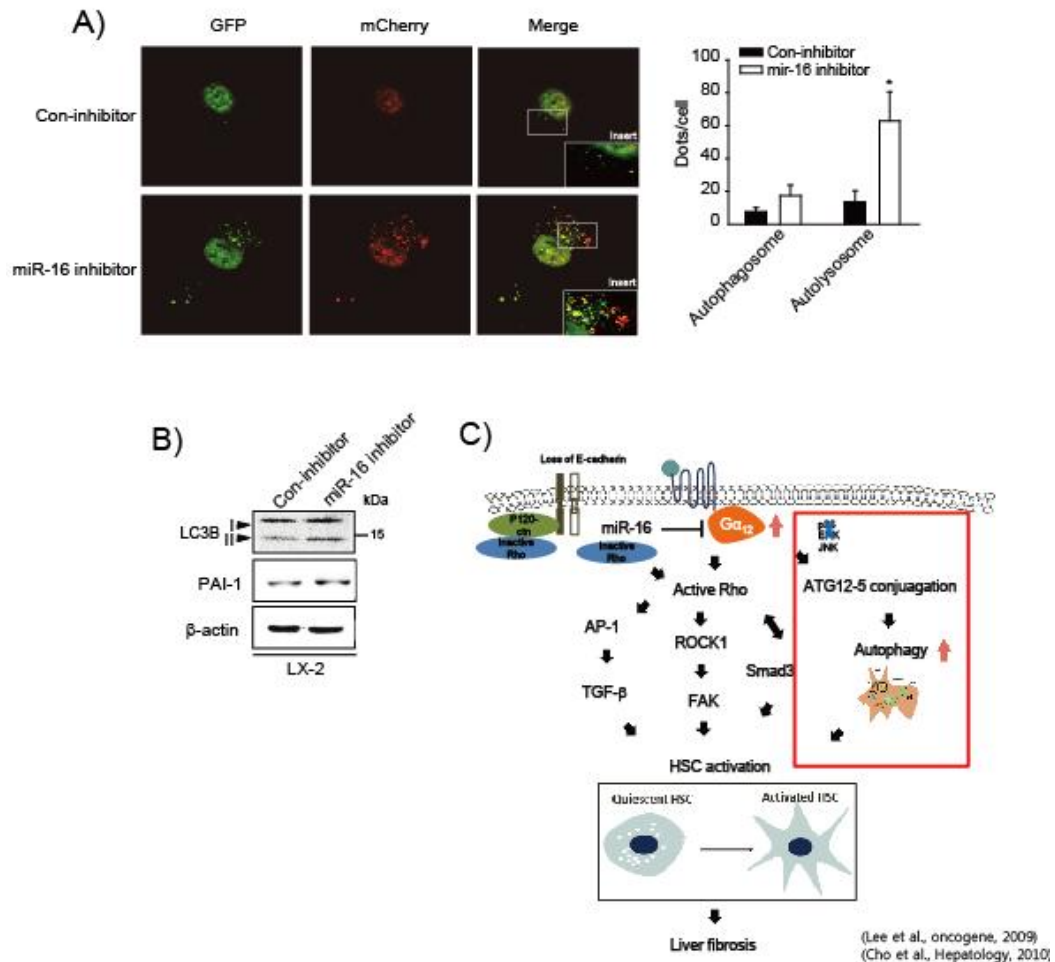


Figure 17. Dysregulation of miR-16 promoted autophagy in HSCs.

A) Representative photomicrographs of immunostaining for mCherry/GFP-LC3B puncta. LX-2 cells were infected with ad-mCherry-GFP-LC3 following transfection with miR-16 inhibitor (or control) for 72 h (magnification: 60×). Data represent the mean \pm S.E.M (n=3 each); *p<0.05, significant compared with red only punctae of Con-

inhibitor transfected LX-2 cells.

B) Immunoblots for LC3B-I/II and PAI-1 in LX-2 cells transfected with miR-16 inhibitor for 72 h.

C) Schematic diagram illustrating the proposed mechanism by which $G\alpha_{12}$ overexpression promotes HSC activation and related pathways. A red square indicates our new findings.

IV. 고 찰

간섬유화가 일어나는 과정 중 휴지기 상태의 간성상세포는 활성화되어 간 손상 자극에 의해 세포외기질을 분비하는 세포인 근섬유화세포로 전환분화하게 된다 (Friedman 2003). 이러한 간성상세포 활성화 과정에 PDGF, TGF β 와 같은 세포외 리간드가 관여한다 (Breitkopf et al. 2006, Breitkopf et al. 2005). 이와 더불어 GPCR 관련 신호들이 섬유화에 관여하는 간성상세포의 생리에 지대한 영향을 미치는 것으로 알려져있다. Thrombin, LPA, ET-1, S1P, Ang II, 그리고 acetylcholine과 같은 GPCR 리간드들의 양이 정상 간에서와 비교하여 섬유화된 간조직에서 증가되어 있으며, 이러한 리간드에 의해 활성화되는 대부분의 GPCR은 G α_{12} 와 결합한다 (Liu et al. 2011, Duplantier et al. 2004, Bataller et al. 2003, Rockey et al. 1998, Ikeda et al. 1998). 더불어 이와 같은 GPCR 리간드들과 결합하는 GPCR의 발현양 또한 섬유화 환경에서 증가되어 있다 (Bahde et al. 2011, Cho et al. 2000, Anselmi et al. 2002, Li et al. 2011, Fiorucci et al. 2004, Yoshiji et al. 2001, Rancoule et al. 2011). 이렇게 증가된 리간드에 의해 GPCR에 전달된 신호는 G α 단백을 통하여 증폭된다. 실제로 리간드에 의한 GPCR의 활성화는 수초동안 일어나지만, G α 단백질에 의해 활성화되는 하위 신호들은 최대 20분까지 지속되게 된다. 이러한 현상은 활성화된 G α 단백질의 상태가 특징적으로 수십초 동안 유지되어 처음의 신호를 크게 증폭시키는 데서 기인한다. 따라서 이러한 사실을 통해 G α 단백질의 발현양에

따라 GPCR 신호의 경감의 폭이 크게 달라질 수 있음을 추측해 볼 수 있다. 그러므로 간섬유화 및 간성상세포 활성화 과정에 있어서 $G\alpha_{12}$ 의 발현 변화는 간성상세포의 생화학적, 생리학적 활성을 증폭 또는 감소시키는데 있어서 중요한 역할을 미칠 것이다. 한편, 세포 증식 및 이동 현상에서 $G\alpha_{12}$ 의 역할이 알려져 있음에도 불구하고 (Jung et al. 2014, Yang et al. 2015), 간섬유화 과정에서의 $G\alpha_{12}$ 발현 및 기능, 관련 신호에 관한 연구는 전혀 이루어지지 않았다. 본 연구를 통해 간섬유화 과정의 간성상세포에서 $G\alpha_{12}$ 발현이 증가함을 밝혔다. 간성상세포에서 여러 $G\alpha$ 소단위체들 중에 $G\alpha_{12}$ 가 가장 많이 발현되어 있음을 보여주는 단백질체 분석 데이터는 간성상세포의 전환분화 과정에서의 $G\alpha_{12}$ 의 잠재적 역할을 지지해 주며, 이러한 사실은 면역조직화학적 분석법을 통한 실험 결과를 통해서도 증명되었다. 이 결과들은 다양한 간섬유화를 매개하는 리간드에 의해 활성화되는 GPCR들에 의해 수렴되는 신호들이 증가된 $G\alpha_{12}$ 의 발현에 의해 증폭됨을 암시한다. $G\alpha_{12}$ 결손이 간독성 물질에 의한 간섬유화 진행 및 이와 수반되는 염증 반응을 억제하는 현상과 이 억제 현상이 간성상세포 특이적 발현에 의해 반전됨이 이러한 주장을 지지해 주고 있다. 이와 더불어, 본 연구자는 $G\alpha_{12}$ 의 다른 family인 $G\alpha_{13}$ 의 발현이 간섬유화 샘플 및 활성화된 간성상세포에서의 증가가 $G\alpha_{12}$ 에 비해 미미함을 발견하였다. $G\alpha_{12}$ family인 $G\alpha_{12}$ 과 $G\alpha_{13}$ 은 하위 활성화 신호 체계를 공유하여 리간드에 대한 반응성이 두 단백질이 비슷한 것으로 알려져 있으나, 실제 G12 family를 활성화시키는 리간드에 대한

반응성의 차이는 존재한다. 그 예로, LPA는 $G\alpha_{12}$ 와 $G\alpha_{13}$ 모두를 활성화시키는 리간드이지만, $G\alpha_{13}$ 에 의해서만 긴장섬유조립반응을 유도하게 된다 (Gohla, Harhammer and Schultz 1998). 한편, endothelin A, thrombin에 의해 유도되는 긴장섬유형성 반응에는 $G\alpha_{12}$ 만이 관여하게 된다. GPCR이 $G\alpha_{12}$ 또는 $G\alpha_{13}$ 를 선택적으로 활성화시키는 것은 수용체들의 $G\alpha_{12}$ 또는 $G\alpha_{13}$ 에 대한 친화도 차이 또는 각 수용체에 미리 결합되어 있는 $G\alpha_{12}$ 또는 $G\alpha_{13}$ 이 존재할 수 있기 때문이다 (Gohla et al. 1999). 따라서 간성상세포의 전환분화 과정에서 활성화되는 GPCR 신호들이 $G\alpha_{13}$ 보다는 $G\alpha_{12}$ 를 선택적으로 유도시켜 GPCR과 $G\alpha_{12}$ 과의 결합을 늘림으로써 이에 관련된 GPCR 신호를 강화시킬 것이라고 사료된다.

$G\alpha_{12}$ 의 간성상세포 특이적 발현으로 인한 *Gna12* 결손 동물의 간섬유화 촉진은 간섬유화의 발달 및 진행에 있어서 간성상세포에서의 $G\alpha_{12}$ 발현 증가로 인한 그 역할을 엿볼 수 있게 한다. 이러한 결과는 $G\alpha_{12}$ 멤버들이 *Tgfb1* 발현을 조절한다는 기존의 본 연구진의 보고와 일맥상통한다 (Lee et al. 2009). 또한, 간성상세포 특이적인 $G\alpha_{12}$ 의 발현 증가는 *Gna12* 결손으로 인한 ALT, AST 및 LDH 활성 감소를 일부 반전시킴이 관찰되었다. 이 때, 통계적 유의성의 결여는 동물 개체 간의 차이 또는 $G\alpha_{12}$ 가 결여된 다른 종류의 세포들의 결여에 의한 것 (즉, 단핵구 또는 대식세포의 염증 신호의 감소)이라 사료된다. 간섬유화가 간세포, 간성상세포 및 쿠퍼세포와 같은 여러 가지 세포 간의 복잡한 상호 작용에 의해 점진적으로 진행되는

질환이라는 사실이 이러한 주장을 지지해 준다.

자가포식 현상은 간성상세포가 lipid droplet을 분해시키고 미토콘드리아의 베타 산화를 통해 전환분화하는데 필요한 에너지를 제공한다 (Hernandez-Gea et al. 2012). 이를 통해 간성상세포는 세포의 증식, 수선, 에너지 항상성 유지에 필요한 세포내 에너지 요구량을 유지하게 된다 (Hernandez-Gea et al. 2012). 따라서, 자가포식 현상은 간성상세포를 포함하는 여러 세포들의 분화와 관련된 신호 전달 체계를 조절하는데 있어 중요하다 (Mizushima and Levine 2010, Hernandez-Gea et al. 2012). 그럼에도 불구하고, 자가포식 현상이 간성상세포의 활성화를 조절하는 분자적 메커니즘에 관한 연구는 미비한 실정이다. 본 연구에서, 간성상세포에서 발현이 증가된 $G\alpha_{12}$ 가 ATG12-5의 발현을 증가시켜 자가포식 현상을 조절함을 밝혔다. 이러한 결과는 $G\alpha_{12}$ 와 결합하는 GPCR을 활성화시키는 리간드인 AngII, thrombin 및 S1P가 자가포식 현상을 활성화시킨다는 사실과 일치하며 (Wang et al. 2013, Yadav et al. 2010, Hu et al. 2011, Chang et al. 2009), 간성상세포 특이적으로 $G\alpha_{12}$ 를 발현시킨 동물의 간조직 샘플에서의 ATG12-5와 LC3B-II의 경미한 변화가 관찰된 결과를 통해 지지된다. ATG12-5의 형성이 자가포식 현상에 있어서 주요한 단계이기 때문에 (Mizushima, Yoshimori and Ohsumi 2011), $G\alpha_{12}$ 가 간성상세포의 자가포식 현상 신호 증폭 및 간섬유화에 있어서 결정적인 인자로 작용할 수 있음을 시사한다.

JNK 활성화는 간성상세포를 활성화시키는 싸이토카인인 TGF- β , PDGF 및

Ang II를 처리 시 α -SMA의 발현을 증가시킨다 (Kluwe et al. 2010). JNK는 또한 다양한 자가포식 현상의 단계에 작용하는 것으로 알려져있다. 즉, ATG 분자들과 상호작용을 하고, Beclin 분자의 발현을 증가 및 활성화시키며, ATG7과 ATG5의 발현을 증가시킨다 (Zhou et al. 2015). 기존에 $G\alpha_{12}$ 관련 신호 체계에서 다양한 생물학적 작용을 하는 인산화효소로써 JNK를 규명한 바 있다. 즉, cyclooxygenase 2 및 IkappaB-alpha의 분해를 통한 the inducible isoform of nitric oxide synthase 분자들의 발현 유도 현상과 암세포 침윤에 JNK가 $G\alpha_{12}$ 의 하위 신호로 그 역할을 함을 밝혔다 (Ki et al. 2007, Jung et al. 2014, Jho, Davis and Malbon 1997, Kang et al. 2003). 본 연구에서 $G\alpha_{12}$ 가 ATG12-5 발현을 유도하여 자가포식 현상을 활성화시킴에 있어 그 하위 신호로써 JNK를 규명하였다. JNK의 동형 단백질이 간성상세포의 증식과 활성화에 있어 상충되는 보고들이 존재한다. *Jnk1*의 결손은 간섬유화를 억제시키고, *Jnk2*의 결손은 담즙 울체 동물 모델에서 간섬유화를 촉진시켰다 (Kluwe et al. 2010). 그러나 본 연구에서는 JNK1, JNK2 모두 ATG12-5 형성에 관여하는 것으로 밝혀졌다. ATG12-5 형성을 조절하는 자세한 분자적 메커니즘에 관해서는 아직 밝혀진 바가 없다. JNK1과 JNK2가 다른 분자들을 경유하여 ATG12-5 형성을 할 것으로 추정된다. JNK1과 JNK2가 간 손상 자극으로 인한 간질환의 발병과 관련된 다양한 메커니즘에 공통되게 또는 다르게 작용하는 것으로 알려져 있으므로 (Hirosumi et al. 2002, Chen et al. 2002, Wang et al. 2006), 간성상세포의 전환 분화의 개시 및 진행에 있어서의 이들의 역할에 관한 추가적인 연구가

필요하다.

한편, JNK는 자가포식 현상 뿐만 아니라 세포자멸사에도 작용하는 것으로 알려져 있다; JNK는 c-Jun과 ATF-2의 인산화를 통한 AP-1의 활성화 또는 Fas/FasL 신호 체계 관련 단백질들의 발현 유도가 cleaved caspase3를 증가시킴으로써 세포자멸사를 촉진한다 (Tang et al. 2012). LX-2 세포에 JNK 과발현 후 세포자멸사관련 단백질들의 발현을 관찰하였을 때, 세포자멸사를 촉진하는 단백질인 Bax는 감소되고 pro-caspase3의 양이 증가되었다 (Data not shown). 이를 통해 JNK를 매개한 반응은 세포자멸사보다는 자가포식 현상 쪽으로 작용함을 알 수 있다. 실제로 JNK가 세포자멸사 또는 자가포식 현상에 영향을 미치는 방향은 세포와 자극에 따라 달라지는 것으로 알려져 있다 (Sui et al. 2014).

더불어, $G\alpha_{12}$ 에 의한 ATG12-5 발현 유도를 통한 자가포식 현상을 활성화시키는 과정에 JNK 이외에 다른 하위 신호가 관여 가능성을 실험해 보았다. JNK와 함께 MAPK로 불리우는 ERK와 p38의 경우 ATG12-5 발현에 영향을 미치지 않았다. $G\alpha_{12}$ 의 잘 알려진 하위 신호인 small GTP-결합 단백질인 Rho family인 RhoA, Rac 및 Cdc42도 ATG12-5 발현 변화를 유도하지 못하였다 (data not shown). 한편, 최근 보고에 의하면 RhoA의 하위 신호로 알려진 ROCK1이 Beclin1을 인산화시킴으로써 자가포식 작용을 유도한다고 알려져 있다 (Gurkar et al. 2013). 따라서, 자가포식 현상을 활성화시키는 ROCK1의 활성화는 RhoA가 아닌 다른 신호에 의한 활성화로 사료된다.

마이크로 RNA는 최근에 거론되는 단백질의 발현을 억제적으로 조절하는 전사후 조절 메커니즘으로서, 이들은 간성상세포의 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Guo et al. 2009a, Guo et al. 2009b, Ji et al. 2009). 본 연구에서 밝힌 또다른 중요한 결과는 miR-16이 $G\alpha_{12}$ 의 발현을 조절하는 상위 조절자라는 발견이다. miR-16은 간성상세포활성화 과정 중에 현저하게 그 양이 감소하였으며, $G\alpha_{12}$ 의 mRNA에 높은 친화력으로 결합하여 $G\alpha_{12}$ 의 발현을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 또한 miR-16의 양을 변화시켰을 때 자가포식 현상 마커와 유동 현상이 변화시켜 $G\alpha_{12}$ 에 의한 자가포식 현상 조절의 방향과 동일하게 활성화시킨 결과를 통해서도 지지된다. 이러한 결과들은 miR-16의 이상 발현이 $G\alpha_{12}$ 발현 증가를 통한 간성상세포 활성화에 기여한다는 결론을 뒷받침해준다. 이와 더불어, 본 연구자는 miR-16의 이상 발현과 간 섬유화 진행과의 상관 관계를 인간 샘플을 활용하여 밝혔다. 간에 풍부한 것으로 알려진 miR-16은 Bcl-2 및 cyclin D1 분자의 발현을 조절하여 간성상세포의 증식과 세포사멸 저항성에 영향을 미침이 밝혀져 있다 (Guo et al. 2009b, Guo et al. 2009a, Landgraf et al. 2007). 이는 miR-16의 이상 발현이 간성상세포의 활성화에 있어서 매우 중요함을 주지한다. 또, 활성화된 간성상세포에서 $G\alpha_{12}$ 를 타겟팅하는 것으로 예측되는 또다른 마이크로 RNA들인 miR-15a, miR-15b, miR-195, miR-424와 miR-497도 하향 조절됨을 관찰하였다. 이 마이크로 RNA들은 miR-16과 동일한 seed sequence를 가지고 있지만 다른 유전체 내에 위치하기 때문에 (Bartel 2009), 이들도 $G\alpha_{12}$ 의 합성에 영향을 미칠 수

있으리라 사료된다. 간성상세포의 전환분화와 이에 따른 세포외기질을 암호화하는 유전자들의 발현 변화는 miR-29b, miR-150 및 miR-194에 의해서도 일어남이 보고되어 있다 (Venugopal et al. 2010, Ogawa et al. 2010). 따라서, 간성상세포 활성화는 다양한 마이크로 RNA들의 다발적인 역할에 의해 일어나는 현상으로 판단된다.

한편, miR-16은 앞서 기술한 간성상세포에서 조절하는 타겟들 이외에 다양한 세포에서 80여 개의 단백질들의 합성을 조절하는 것으로 보고되어 있다. miR-16이 조절하는 타겟들은 세포의 부착 및 이동, 발암 억제, 세포 분열, DNA 수선 등에 관여한다. 간성상세포에 miR-16을 발현시켜 $G\alpha_{12}$ 를 하향조절시키는 방법을 통해 간섬유화를 치료할 경우, miR-16에 의해 조절받는 세포 증식 및 항세포사멸 관련 분자들의 발현을 억제하여 간섬유화를 치료하는 효과를 기대할 수 있는 반면에 세포의 정상적인 기능-DNA 수선, mitochondria 구성, 세포의 발달 과정, glycolysis 및 gluconeogenesis 등-을 유지하는데 관여하는 단백질 및 발암억제관련단백질의 발현들을 억제하여 세포의 정상 기능을 손상시키거나 발암을 촉진시킬 수 있는 부작용이 나타날 수 있다. 따라서, 본 치료법을 사용하여 간섬유화를 치료하고자 할 때 감소되어 있는 miR-16의 양을 정상적인 수준까지만 회복시키는 것이 중요하리라 사료된다.

$G\alpha_{12}$ family인 $G\alpha_{12}$ 와 $G\alpha_{13}$ 은 Rho/Rac 의존적인 AP-1 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Lee et al. 2009). 또한, $G\alpha_{12}$ 신호 경로는 Nrf2의

유비퀴티네이션과 분해를 증가시킨다 (Cho et al. 2007). 간독성물질에 의해 유발되는 간세포 손상이 간성상세포를 활성화시키는 과정에서 산화적 스트레스가 증가되고 Nrf2의 발현이 감소되는 현상의 보고들로 인해 (Lu et al. 2016), Nrf2가 간성상세포 활성화를 억제시킬 수 있는 유망한 타겟 분자로 거론되고 있다 (Oh et al. 2012). Nrf2 활성화가 TGF- β /Smad 신호를 억제시켜 항섬유화 작용이 있다는 보고들도 이와 일맥상통한다 (Oh et al. 2012). 이러한 발견들과 결과를 토대로 하여, $G\alpha_{12}$ 의 발현 증가로 인한 간성상세포 활성화는 Nrf2의 분해 증가와 이로 인한 TGF- β /Smad 신호 경로의 활성화에 의해서도 부분적으로 일어날 수 있음을 추론해 볼 수 있다.

종합할 때, 본 연구에서는 간섬유화 및 간성상세포 전환분화 과정에서 $G\alpha_{12}$ 가 발현이 증가하게 되고, 이는 간에 풍부한 것으로 알려진 miR-16의 발현 감소에서 기인한 것임을 발견하였다. 이러한 현상은 JNK 매개로한 ATG12-5 의존적 자가포식 현상의 활성화시키며 나아가 간섬유화를 유발시키게 된다. 본 연구에서 제시한 결과들은 간질환의 예방 및 치료에 있어 새로운 타겟으로서 $G\alpha_{12}$ 및 관련 분자들의 약물학적 응용 가능성을 제시한다.

V. 참고 문헌

- Anselmi, K., V. M. Subbotin, E. Nemoto & C. R. Gandhi (2002) Accelerated reversal of carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats by the endothelin receptor antagonist TAK-044. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 17, 589-97.
- Bahde, R., L. Kebschull, S. Stoppeler, A. Zibert, R. Siaj, J. P. Holzen, E. Minin, H. H. Schmidt, H. U. Spiegel & D. Palmes (2011) Role of angiotensin-1 receptor blockade in cirrhotic liver resection. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 31, 642-55.
- Bartel, D. P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136, 215-33.
- Bataller, R. & D. A. Brenner (2005) Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 115, 209-18.
- Bataller, R., P. Sancho-Bru, P. Gines, J. M. Lora, A. Al-Garawi, M. Sole, J. Colmenero, J. M. Nicolas, W. Jimenez, N. Weich, J. C. Gutierrez-Ramos, V. Arroyo & J. Rodes (2003) Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology*, 125, 117-25.
- Breitkopf, K., P. Godoy, L. Ciucan, M. V. Singer & S. Dooley (2006) TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*, 44, 57-66.
- Breitkopf, K., C. Roeyen, I. Sawitza, L. Wickert, J. Floege & A. M. Gressner (2005) Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors alpha and beta in activated rat hepatic stellate cells (HSC). *Cytokine*, 31, 349-57.
- Chang, C. L., M. C. Ho, P. H. Lee, C. Y. Hsu, W. P. Huang & H. Lee (2009) S1P(5) is required for sphingosine 1-phosphate-induced autophagy in human prostate cancer PC-3 cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 297, C451-8.

- Chen, N., Q. B. She, A. M. Bode & Z. Dong (2002) Differential gene expression profiles of Jnk1- and Jnk2-deficient murine fibroblast cells. *Cancer research*, 62, 1300-4.
- Cho, I. J., Y. W. Kim, C. Y. Han, E. H. Kim, R. A. Anderson, Y. S. Lee, C. H. Lee, S. J. Hwang & S. G. Kim (2010) E-cadherin antagonizes transforming growth factor beta1 gene induction in hepatic stellate cells by inhibiting RhoA-dependent Smad3 phosphorylation. *Hepatology*, 52, 2053-64.
- Cho, J. J., B. Hocher, H. Herbst, J. D. Jia, M. Ruehl, E. G. Hahn, E. O. Riecken & D. Schuppan (2000) An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology*, 118, 1169-78.
- Cho, M. K., W. D. Kim, S. H. Ki, J. I. Hwang, S. Choi, C. H. Lee & S. G. Kim (2007) Role of Galpha12 and Galpha13 as novel switches for the activity of Nrf2, a key antioxidative transcription factor. *Molecular and cellular biology*, 27, 6195-208.
- Choi, H. S., A. M. Bode, J. H. Shim, S. Y. Lee & Z. Dong (2009) c-Jun N-terminal kinase 1 phosphorylates Myt1 to prevent UVA-induced skin cancer. *Molecular and cellular biology*, 29, 2168-80.
- Duplantier, J. G., L. Dubuisson, N. Senant, G. Freyburger, I. Laurendeau, J. M. Herbert, A. Desmouliere & J. Rosenbaum (2004) A role for thrombin in liver fibrosis. *Gut*, 53, 1682-7.
- Fiorucci, S., E. Antonelli, E. Distrutti, B. Severino, R. Fiorentina, M. Baldoni, G. Caliendo, V. Santagada, A. Morelli & G. Cirino (2004) PAR1 antagonism protects against experimental liver fibrosis. Role of proteinase receptors in stellate cell activation. *Hepatology*, 39, 365-75.
- Friedman, S. L. (1993) Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *The New England journal of medicine*, 328, 1828-35.
- (2003) Liver fibrosis -- from bench to bedside. *Journal of hepatology*, 38 Suppl 1, S38-53.
- Gohla, A., R. Harhammer & G. Schultz (1998) The G-protein G13 but not G12

- mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *The Journal of biological chemistry*, 273, 4653-9.
- Gohla, A., S. Offermanns, T. M. Wilkie & G. Schultz (1999) Differential involvement of G α 12 and G α 13 in receptor-mediated stress fiber formation. *The Journal of biological chemistry*, 274, 17901-7.
- Goldsmith, Z. G. & D. N. Dhanasekaran (2007) G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene*, 26, 3122-42.
- Gordeladze, J. O., P. W. Johansen, R. H. Paulssen, E. J. Paulssen & K. M. Gautvik (1994) G-proteins: implications for pathophysiology and disease. *European journal of endocrinology*, 131, 557-74.
- Gu, J. L., S. Muller, V. Mancino, S. Offermanns & M. I. Simon (2002) Interaction of G α (12) with G α (13) and G α (q) signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 9352-7.
- Guo, C. J., Q. Pan, B. Jiang, G. Y. Chen & D. G. Li (2009a) Effects of upregulated expression of microRNA-16 on biological properties of culture-activated hepatic stellate cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 14, 1331-40.
- Guo, C. J., Q. Pan, D. G. Li, H. Sun & B. W. Liu (2009b) miR-15b and miR-16 are implicated in activation of the rat hepatic stellate cell: An essential role for apoptosis. *Journal of hepatology*, 50, 766-78.
- Gurkar, A. U., K. Chu, L. Raj, R. Bouley, S. H. Lee, Y. B. Kim, S. E. Dunn, A. Mandinova & S. W. Lee (2013) Identification of ROCK1 kinase as a critical regulator of Beclin1-mediated autophagy during metabolic stress. *Nature communications*, 4, 2189.
- Hernandez-Gea, V., Z. Ghiassi-Nejad, R. Rozenfeld, R. Gordon, M. I. Fiel, Z. Yue, M. J. Czaja & S. L. Friedman (2012) Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology*, 142, 938-46.
- Hirosumi, J., G. Tuncman, L. Chang, C. Z. Gorgun, K. T. Uysal, K. Maeda, M.

- Karin & G. S. Hotamisligil (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420, 333-6.
- Horn, E. M., M. L. Kukin, G. W. Neuberger, R. L. Goldsmith, M. McCarty, M. Gratch, N. Medina, M. Yushak, M. Packer & J. P. Bilezikian (1995) Lymphocyte G proteins reflect response to treatment in congestive heart failure. *American heart journal*, 129, 98-106.
- Hu, S., G. Xi, H. Jin, Y. He, R. F. Keep & Y. Hua (2011) Thrombin-induced autophagy: a potential role in intracerebral hemorrhage. *Brain research*, 1424, 60-6.
- Ichimura, Y., T. Kirisako, T. Takao, Y. Satomi, Y. Shimonishi, N. Ishihara, N. Mizushima, I. Tanida, E. Kominami, M. Ohsumi, T. Noda & Y. Ohsumi (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408, 488-92.
- Ikeda, H., Y. Yatomi, M. Yanase, H. Satoh, A. Nishihara, M. Kawabata & K. Fujiwara (1998) Effects of lysophosphatidic acid on proliferation of stellate cells and hepatocytes in culture. *Biochemical and biophysical research communications*, 248, 436-40.
- Jho, E. H., R. J. Davis & C. C. Malbon (1997) c-Jun amino-terminal kinase is regulated by Galpha12/Galpha13 and obligate for differentiation of P19 embryonal carcinoma cells by retinoic acid. *The Journal of biological chemistry*, 272, 24468-74.
- Ji, J., J. Zhang, G. Huang, J. Qian, X. Wang & S. Mei (2009) Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation. *FEBS letters*, 583, 759-66.
- Jung, H. S., Y. R. Seo, Y. M. Yang, J. H. Koo, J. An, S. J. Lee, K. M. Kim & S. G. Kim (2014) Galpha12gep oncogene inhibits FOXO1 in hepatocellular carcinoma as a consequence of miR-135b and miR-194 dysregulation. *Cellular signalling*, 26, 1456-65.
- Kaartinen, J. M., K. F. LaNoue & J. J. Ohisalo (1994) Quantitation of inhibitory G-proteins in fat cells of obese and normal-weight human subjects. *Biochimica et biophysica acta*, 1201, 69-75.

- Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi & T. Yoshimori (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal*, 19, 5720–8.
- Kang, K. W., S. Y. Choi, M. K. Cho, C. H. Lee & S. G. Kim (2003) Thrombin induces nitric-oxide synthase via Galpha12/13-coupled protein kinase C-dependent I-kappaBalpha phosphorylation and JNK-mediated I-kappaBalpha degradation. *The Journal of biological chemistry*, 278, 17368–78.
- Kawanabe, Y., Y. Okamoto, K. Nozaki, N. Hashimoto, S. Miwa & T. Masaki (2002) Molecular mechanism for endothelin-1-induced stress-fiber formation: analysis of G proteins using a mutant endothelin(A) receptor. *Molecular pharmacology*, 61, 277–84.
- Kelly, P., P. J. Casey & T. E. Meigs (2007) Biologic functions of the G12 subfamily of heterotrimeric g proteins: growth, migration, and metastasis. *Biochemistry*, 46, 6677–87.
- Ki, S. H., M. J. Choi, C. H. Lee & S. G. Kim (2007) Galpha12 specifically regulates COX-2 induction by sphingosine 1-phosphate. Role for JNK-dependent ubiquitination and degradation of IkappaBalpha. *The Journal of biological chemistry*, 282, 1938–47.
- Kim, S. G., Y. M. Kim, Y. H. Choi, M. G. Lee, J. Y. Choi, J. Y. Han, S. H. Cho, J. W. Jang, S. H. Um, C. Y. Chon, D. H. Lee, J. J. Jang, E. S. Yu & Y. S. Lee (2010) Pharmacokinetics of oltipraz and its major metabolite (RM) in patients with liver fibrosis or cirrhosis: relationship with suppression of circulating TGF-beta1. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 88, 360–8.
- Kiyono, K., H. I. Suzuki, H. Matsuyama, Y. Morishita, A. Komuro, M. R. Kano, K. Sugimoto & K. Miyazono (2009) Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer research*, 69, 8844–52.
- Kluwe, J., J. P. Pradere, G. Y. Gwak, A. Mencin, S. De Minicis, C. H. Osterreicher,

- J. Colmenero, R. Bataller & R. F. Schwabe (2010) Modulation of hepatic fibrosis by c-Jun-N-terminal kinase inhibition. *Gastroenterology*, 138, 347-59.
- Koo, J. H., H. J. Lee, W. Kim & S. G. Kim (2016) Endoplasmic Reticulum Stress in Hepatic Stellate Cells Promotes Liver Fibrosis via PERK-Mediated Degradation of HNRNPA1 and Up-regulation of SMAD2. *Gastroenterology*, 150, 181-193 e8.
- Lakner, A. M., H. L. Bonkovsky & L. W. Schrum (2011) microRNAs: fad or future of liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG*, 17, 2536-42.
- Landgraf, P., M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, A. O. Kamphorst, M. Landthaler, C. Lin, N. D. Socci, L. Hermida, V. Fulci, S. Chiaretti, R. Foa, J. Schliwka, U. Fuchs, A. Novosel, R. U. Muller, B. Schermer, U. Bissels, J. Inman, Q. Phan, M. Chien, D. B. Weir, R. Choksi, G. De Vita, D. Frezzetti, H. I. Trompeter, V. Hornung, G. Teng, G. Hartmann, M. Palkovits, R. Di Lauro, P. Wernet, G. Macino, C. E. Rogler, J. W. Nagle, J. Ju, F. N. Papavasiliou, T. Benzing, P. Lichter, W. Tam, M. J. Brownstein, A. Bosio, A. Borkhardt, J. J. Russo, C. Sander, M. Zavolan & T. Tuschl (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 129, 1401-14.
- Lee, C. G., Y. W. Kim, E. H. Kim, Z. Meng, W. Huang, S. J. Hwang & S. G. Kim (2012) Farnesoid X receptor protects hepatocytes from injury by repressing miR-199a-3p, which increases levels of LKB1. *Gastroenterology*, 142, 1206-1217 e7.
- Lee, S. J., J. W. Yang, I. J. Cho, W. D. Kim, M. K. Cho, C. H. Lee & S. G. Kim (2009) The gep oncogenes, Galpha(12) and Galpha(13), upregulate the transforming growth factor-beta1 gene. *Oncogene*, 28, 1230-40.
- Levine, B. & D. J. Klionsky (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell*, 6, 463-77.
- Li, C., S. Zheng, H. You, X. Liu, M. Lin, L. Yang & L. Li (2011) Sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptors are involved in human liver fibrosis by

- action on hepatic myofibroblasts motility. *Journal of hepatology*, 54, 1205-13.
- Liu, X., S. Yue, C. Li, L. Yang, H. You & L. Li (2011) Essential roles of sphingosine 1-phosphate receptor types 1 and 3 in human hepatic stellate cells motility and activation. *Journal of cellular physiology*, 226, 2370-7.
- Lu, C., W. Xu, F. Zhang, J. Shao & S. Zheng (2016) Nrf2 knockdown attenuates the ameliorative effects of ligustrazine on hepatic fibrosis by targeting hepatic stellate cell transdifferentiation. *Toxicology*.
- Milligan, G. & A. Green (1991) Agonist control of G-protein levels. *Trends in pharmacological sciences*, 12, 207-9.
- Mizushima, N. & B. Levine (2010) Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature cell biology*, 12, 823-30.
- Mizushima, N., T. Noda, T. Yoshimori, Y. Tanaka, T. Ishii, M. D. George, D. J. Klionsky, M. Ohsumi & Y. Ohsumi (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395, 395-8.
- Mizushima, N., T. Yoshimori & Y. Ohsumi (2011) The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, 107-32.
- Neves, S. R., P. T. Ram & R. Iyengar (2002) G protein pathways. *Science*, 296, 1636-9.
- Ogawa, T., M. Iizuka, Y. Sekiya, K. Yoshizato, K. Ikeda & N. Kawada (2010) Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 391, 316-21.
- Oh, C. J., J. Y. Kim, A. K. Min, K. G. Park, R. A. Harris, H. J. Kim & I. K. Lee (2012) Sulforaphane attenuates hepatic fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor-beta/Smad signaling. *Free radical biology & medicine*, 52, 671-82.
- Ohsumi, Y. & N. Mizushima (2004) Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. *Seminars in cell & developmental biology*, 15,

231-6.

- Oldham, W. M. & H. E. Hamm (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, 60-71.
- Qi, Z., N. Atsuchi, A. Ooshima, A. Takeshita & H. Ueno (1999) Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 2345-9.
- Radhika, V. & N. Dhanasekaran (2001) Transforming G proteins. *Oncogene*, 20, 1607-14.
- Rancoule, C., J. P. Pradere, J. Gonzalez, J. Klein, P. Valet, J. L. Bascands, J. P. Schanstra & J. S. Saulnier-Blache (2011) Lysophosphatidic acid-1-receptor targeting agents for fibrosis. *Expert opinion on investigational drugs*, 20, 657-67.
- Rockey, D. C. & J. J. Chung (1996) Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. *The Journal of clinical investigation*, 98, 1381-8.
- Rockey, D. C., L. Fouassier, J. J. Chung, A. Carayon, P. Vallee, C. Rey & C. Housset (1998) Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells. *Hepatology*, 27, 472-80.
- Rozengurt, E. (2007) Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *Journal of cellular physiology*, 213, 589-602.
- Sui, X., N. Kong, L. Ye, W. Han, J. Zhou, Q. Zhang, C. He & H. Pan (2014) p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer letters*, 344, 174-9.
- Suzuki, H. I., K. Kiyono & K. Miyazono (2010) Regulation of autophagy by transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling. *Autophagy*, 6, 645-7.
- Tang, R. X., F. Y. Kong, B. F. Fan, X. M. Liu, H. J. You, P. Zhang & K. Y. Zheng (2012) HBx activates FasL and mediates HepG2 cell apoptosis through

- MLK3-MKK7-JNKs signal module. *World journal of gastroenterology*, 18, 1485-95.
- Thoen, L. F., E. L. Guimaraes, L. Dolle, I. Mannaerts, M. Najimi, E. Sokal & L. A. van Grunsven (2011) A role for autophagy during hepatic stellate cell activation. *Journal of hepatology*, 55, 1353-60.
- Trzaskowski, B., D. Latek, S. Yuan, U. Ghoshdastider, A. Debinski & S. Filipek (2012) Action of molecular switches in GPCRs--theoretical and experimental studies. *Current medicinal chemistry*, 19, 1090-109.
- Venugopal, S. K., J. Jiang, T. H. Kim, Y. Li, S. S. Wang, N. J. Torok, J. Wu & M. A. Zern (2010) Liver fibrosis causes downregulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 298, G101-6.
- Wadsworth, S. J., G. Gebauer, G. D. van Rossum & N. Dhanasekaran (1997) Ras-dependent signaling by the GTPase-deficient mutant of Galpha12. *The Journal of biological chemistry*, 272, 28829-32.
- Wang, X., Y. Dai, Z. Ding, M. Khaidakov, F. Mercanti & J. L. Mehta (2013) Regulation of autophagy and apoptosis in response to angiotensin II in HL-1 cardiomyocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 440, 696-700.
- Wang, Y., R. Singh, J. H. Lefkowitz, R. M. Rigoli & M. J. Czaja (2006) Tumor necrosis factor-induced toxic liver injury results from JNK2-dependent activation of caspase-8 and the mitochondrial death pathway. *The Journal of biological chemistry*, 281, 15258-67.
- Wise, A., T. W. Lee, D. J. MacEwan & G. Milligan (1995) Degradation of G11 alpha/Gq alpha is accelerated by agonist occupancy of alpha 1A/D, alpha 1B, and alpha 1C adrenergic receptors. *The Journal of biological chemistry*, 270, 17196-203.
- Yadav, A., S. Vallabu, S. Arora, P. Tandon, D. Slahan, S. Teichberg & P. C. Singhal (2010) ANG II promotes autophagy in podocytes. *American journal of physiology. Cell physiology*, 299, C488-96.

- Yang, Y. M., W. H. Lee, C. G. Lee, J. An, E. S. Kim, S. H. Kim, S. K. Lee, C. H. Lee, D. N. Dhanasekaran, A. Moon, S. Hwang, S. J. Lee, J. W. Park, K. M. Kim & S. G. Kim (2015) Galpha12 gep oncogene deregulation of p53-responsive microRNAs promotes epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 34, 2910-21.
- Yoshiji, H., S. Kuriyama, J. Yoshii, Y. Ikenaka, R. Noguchi, T. Nakatani, H. Tsujinoue & H. Fukui (2001) Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology*, 34, 745-50.
- Zhao, S., K. Venkatasubbarao, J. W. Lazor, J. Sperry, C. Jin, L. Cao & J. W. Freeman (2008) Inhibition of STAT3 Tyr705 phosphorylation by Smad4 suppresses transforming growth factor beta-mediated invasion and metastasis in pancreatic cancer cells. *Cancer research*, 68, 4221-8.
- Zhou, Y. Y., Y. Li, W. Q. Jiang & L. F. Zhou (2015) MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. *Bioscience reports*, 35.

VI. Abstract

Antifibrotic targets in hepatic stellate cells regulated by G protein signaling pathway

Kyu Min Kim

Advisor: Prof. Sang Geon Kim

G protein-coupled receptors (GPCRs) recognize extracellular ligands, and their related downstream molecules and pathways, and their activation and subsequent downstream activity are promoted by guanine nucleotide-binding α -subunits ($G\alpha$) proteins. Thus, $G\alpha$ levels may have a profound effect on the blunting or amplification of biochemical and physiological activities. Among the $G\alpha$ proteins, $G\alpha_{12}$ members have attracted particular interest owing to their potent transforming capacity. Specifically, the $G\alpha_{12}$ protein transduces signals to control cell proliferation, migration, inflammation, and actin stress-fiber formation. Additionally, GPCRs as well as their ligands that promote specific GPCR coupling to $G\alpha_{12}$ [i.e., sphingosine-1-phosphate (S1P), lysophosphatidic acid (LPA), angiotensin II (Ang II), thrombin, and endothelin-1 (ET-1)] are implicated in liver fibrosis; therefore, it is expected that $G\alpha_{12}$ levels may contribute to regulate GPCR-related signalings in hepatic stellate cells (HSCs). However, the study whether $G\alpha_{12}$ is overexpressed in HSCs, and if so, what the impact is on liver fibrosis and how it is regulated has not been investigated yet.

In this study, we hypothesized that $G\alpha_{12}$ overexpression in HSCs which leads to activation of GPCR signaling, facilitates liver fibrosis is upregulated in HSCs and regulates autophagy. To demonstrate this hypothesis, we examined that 1) $G\alpha_{12}$ was

overexpressed in HSCs and, if so, what the impact is on liver fibrosis, 2) $G\alpha_{12}$ overexpression in activated HSCs was mediated by dysregulation of a specific microRNA (miR) abundant in HSCs, and 3) $G\alpha_{12}$ -mediated HSC activation promoted autophagy via modulation of autophagy-related proteins.

First, we investigated the expression and function of $G\alpha_{12}$ in activated HSCs and liver fibrosis models. $G\alpha_{12}$ was overexpressed in activated HSCs or fibrotic liver in mice and immunohistochemically stained with α -smooth muscle actin. In a mouse fibrosis model, whole-body *Gna12* knockout (KO) prevented increases in liver-injury markers, histopathological changes, and fibrogenic gene induction, all of which were reversed following HSC-specific lentiviral delivery of $G\alpha_{12}$. Additionally, immunoblots for PAI-1 and/or α -SMA showed appropriate changes in HSC activation in accordance with $G\alpha_{12}$, confirming the link between $G\alpha_{12}$ and HSC activation.

Next, this study revealed that $G\alpha_{12}$ overexpression was regulated by miR dysregulation. Among the microRNAs putatively binding to the 3'-UTR of $G\alpha_{12}$, miR-16 was the most abundant in quiescent HSCs, having high affinity for $G\alpha_{12}$, but was markedly decreased in activated HSCs. In a fibrosis animal model or patients with severe fibrosis, miR-16 levels were lower than in the corresponding controls. MiR-16 directly inhibited *de novo* synthesis of $G\alpha_{12}$, as indicated by the results of mimic and inhibitor transfection experiments.

Finally, we explored that $G\alpha_{12}$ overexpression promoted HSC activation and consequent liver fibrosis via autophagy induction. Recently, it is reported that autophagy was associated with establishment of activated HSC phenotypes responsible for liver fibrosis. We demonstrated that $G\alpha_{12}$ activation of HSCs promoted autophagy accompanying JNK-dependent ATG12-5 conjugation. Besides, modulations of miR-16 altered autophagy in HSCs.

In summary, our results showed that 1) $G\alpha_{12}$ was overexpressed in activated HSCs, which promoted liver fibrosis progression, 2) $G\alpha_{12}$ overexpression in activated HSCs was due to dysregulation of a specific miR abundant in HSCs, and 3) this event was mediated

by c-Jun N-terminal kinase-dependent ATG12-5 formation and the induction of autophagy. Given the lack of understanding on the role of $G\alpha_{12}$ in HSC trans-differentiation and the potential link between $G\alpha_{12}$ and autophagy, this study for the first time focused on the expression and function of $G\alpha_{12}$ and demonstrated that $G\alpha_{12}$ was a novel target for HSC activation. These findings of $G\alpha_{12}$ and the regulatory molecules provided new targets for the prevention and treatment of liver fibrosis.

Keywords: liver fibrosis, hepatic stellate cell, $G\alpha_{12}$, microRNA, miR-16, autophagy, ATG12-5, JNK

Student ID Number: 2011-30501

VII. *Curriculum Vitae*

NAME : Kyu Min Kim (Mi Ra Kim)
DATE OF BIRTH : July 13, 1984
ADDRESS : 29-308, College of Pharmacy, Seoul National University
1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, Korea, 151-742
Tel: +822-880-7840 Fax: +822-872-1795
Cellular phone: +82-10-8607-7226
E-mail: mirakim01@snu.ac.kr

EDUCATION

- **Seoul National University**, Seoul, Republic of Korea 2011 – Present
Ph.D. Candidate in Pharmacy
 - Concentration: Molecular Pharmacology
 - Thesis: Antifibrotic targets in hepatic stellate cells regulated by $G\alpha$ protein signaling pathway
 - Advisor: Professor Dr. Sang Geon Kim
- **Chosun University**, Gwangju, Republic of Korea 2007 – 2009
M.S. in Pharmacy
 - Concentration: Molecular Pharmacology
 - Thesis: Studies on the molecular mechanism of epithelial mesenchymal transition in tamoxifen-resistant breast cancer cells
 - Advisor: Professor Dr. Keon Wook Kang
- **Chosun University**, Gwangju, Republic of Korea 2003 – 2007
B.S. in Pharmacy

EMPLOYMENTS

- **Researcher** 2013 – Present
 - Research Institute of Pharmaceutical Science, College of Pharmacy,
Seoul National University
- **Researcher** Mar. 2014 – Present

– Research Institute of Pharmaceutical Science,
College of Pharmacy, Chosun University

■ **Researcher**

Sep. 2010 – Feb. 2011

– Innovative Drug Research Center for Metabolic and Inflammatory Disease,
College of Pharmacy, Seoul National University

■ **Pharmacist**

Mar. 2009 – Dec. 2009

– Chonnam National University Hospital

PROFESSIONAL LICENSE

■ **Registered Pharmacist (Republic of Korea)**

2007 – Present

PUBLICATIONS

1. **Kim KM**, Han CY, Kim JY, Cho SS, Kim YS, Koo JH, Lee JM, Lim SC, Kang KW, Kim JS, Hwang SJ, Ki SH, Kim SG. (2017) $G\alpha_{12}$ overexpression induced by miR16 dysregulation contributes to liver fibrosis by promoting autophagy in hepatic stellate cells. *J Hepatol* in press
2. Yang JH, Cho SS, **Kim KM**, Kim EJ, Park EY, Lee JH, Ki SH. (2017) Neoagaroooligosaccharide enhances the level and efficiency of the LDL receptor and contributes to the improvement of cholesterol homeostasis. *J Funct Foods* 38:529-539.
3. Kim SJ*, **Kim KM***, Yang JH, Cho SS, Lee SK, Ku SK, Cho IJ, Ki SH. (2017) Sestrin2 Protects Against Acetaminophen-induced Liver Injury. *Chem Biol Interact.* 1(269):50-58 (*equal contribution).
4. Jang CH*, **Kim KM***, Yang JH, Cho SS, Kim SJ, Shin SM, Cho IJ, Ki SH. (2016) The Role of Lipin-1 in the Regulation of Fibrogenesis and TGF- β Signaling in Hepatic Stellate Cells. *Toxicol Sci.* 153(1):28-38 (*equal contribution).
5. Yang JH, Kim SC, **Kim KM**, Jang CH, Cho SS, Kim SJ, Ku SK, Cho IJ, Ki SH. (2016) Isorhamnetin attenuates liver fibrosis by inhibiting TGF- β /Smad signaling and relieving oxidative stress. *Eur J Pharmacol.* 783:92-102.

6. **Kim KM**, Yang JH, Shin SM, Cho IJ, Ki SH. (2015) Sestrin2: A Promising Therapeutic Target for Liver Diseases. *Biol Pharm Bull.* 38(7):966-70.
7. Han JY, Cho SS, Yang JH, **Kim KM**, Jang CH, Park DE, Bang JS, Jung YS, Ki SH. (2015) The chalcone compound isosalipurposide (ISPP) exerts a cytoprotective effect against oxidative injury via Nrf2 activation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 287(1):77-85.
8. Kim MG, Yang JH, **Kim KM**, Jang CH, Jung JY, Cho IJ, Shin SM, Ki SH. (2015) Regulation of Toll-like receptor-mediated Sestrin2 induction by AP-1, Nrf2, and the ubiquitin-proteasome system in macrophages. *Toxicol Sci.* 144(2):425-35.
9. Yang JH, **Kim KM**, Kim MG, Seo KH, Han JY, Ka SO, Park BH, Shin SM, Ku SK, Cho IJ, Ki SH. (2015) Role of sestrin2 in the regulation of proinflammatory signaling in macrophages. *Free Radic Biol Med.* 78:156-67.
10. **Kim KM**, Kim SG. (2014) Autophagy and microRNA dysregulation in liver diseases. *Arch Pharm Res.* 37(9):1097-116.
11. Kim JA, **Kim MR**, Kim O, Phuong NT, Yun J, Oh WK, Bae K, Kang KW. (2012) Amurensin G inhibits angiogenesis and tumor growth of tamoxifen-resistant breast cancer via Pin1 inhibition. *Food Chem Toxicol.* 50(10):3625-34.
12. Oh SJ, Kim O, Lee JS, Kim JA, **Kim MR**, Choi HS, Shim JH, Kang KW, Kim YC. (2010) Inhibition of angiogenesis by quercetin in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 48(11):3227-34
13. **Kim MR**, Choi HK, Cho KB, Kim HS, Kang KW. (2009) Involvement of Pin1 induction in epithelial-mesenchymal transition of tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Sci.* 100(10):1834-41.
14. **Kim MR**, Choi HS, Yang JW, Park BC, Kim JA, Kang KW. (2009) Enhancement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis in tamoxifen-resistant breast cancer cells: role of Pin1 overexpression. *Mol Cancer Ther.* 8(8):2163-71.
15. Kim SK, Yang JW, **Kim MR**, Roh SH, Kim HG, Lee KY, Jeong HG, Kang KW. (2009) Increased expression of Nrf2/ARE-dependent anti-oxidant proteins in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Free Radic Biol Med.* 45(4):537-46.

16. Kim JA, Cho KB, **Kim MR**, Park BC, Kim SK, Lee MY, Kang KW. (2008) Decreased production of vascular endothelial growth factor in adriamycin-resistant breast cancer cells. *Cancer Lett.* 268(2):225-32.
17. Yang JW, **Kim MR**, Kim HG, Kim SK, Jeong HG, Kang KW. (2008) Differential regulation of ErbB2 expression by cAMP-dependent protein kinase in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Arch Pharm Res.* 31(3):350-6.
18. **Kim MR**, Choi HS, Heo TH, Hwang SW, Kang KW. (2008) Induction of vascular endothelial growth factor by peptidyl-prolyl isomerase Pin1 in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 369(2):547-53.

PRESENTATIONS (POSTER)

- **Kyu Min Kim**, Ji Young Kim, Sung Hwan Ki. E6AP Induction by microRNA-302c dysregulation prevents TGF- β -dependent fibrogenesis in hepatic stellate cells. The 69th Annual Meeting of The Korean Society of Pharmacology, November 7-8, 2017. The K-hotel, Seoul, Korea

G α_{12} overexpression induced by miR-16 dysregulation contributes to liver fibrosis by promoting autophagy in hepatic stellate cellsKyu Min Kim¹, Chang Yeob Han¹, Ji Young Kim², Sam Seok Cho², Yun Seok Kim¹, Ja Hyun Koo¹, Jung Min Lee¹, Sung Chul Lim³, Keon Wook Kang¹, Jae-Sung Kim⁴, Se Jin Hwang⁵, Sung Hwan Ki², Sang Geon Kim^{1,*}¹College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea; ²College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 61452, Republic of Korea; ³College of Medicine, Chosun University, Gwangju 61452, Republic of Korea; ⁴Departments of Surgery University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA; ⁵College of Medicine, Hanyang University, Seoul 04763, Republic of Korea**Background & Aims:** Hepatic stellate cells (HSCs) have a role in liver fibrosis. Guanine nucleotide-binding α -subunit 12 (G α_{12}) converges signals from G-protein-coupled receptors whose ligand levels are elevated in the environment during liver fibrosis; however, information is lacking on the effect of G α_{12} on HSC trans-differentiation. This study investigated the expression of G α_{12} in HSCs and the molecular basis of the effects of its expression on liver fibrosis.**Methods:** G α_{12} expression was assessed by immunostaining and immunoblot analyses of mouse fibrotic liver tissues and primary HSCs. The role of G α_{12} in liver fibrosis was estimated using a toxicant injury mouse model with G α_{12} gene knockout and/or HSC-specific G α_{12} delivery using lentiviral vectors, in addition to primary HSCs and LX-2 cells using microRNA (miR) inhibitors, overexpression vectors, or adenoviruses. miR-16, G α_{12} , and LC3 were also examined in samples from patients with fibrosis.**Results:** G α_{12} was overexpressed in activated HSCs and fibrotic liver, and was colocalised with desmin. In a carbon tetrachloride-induced fibrosis mouse model, G α_{12} ablation prevented increases in fibrosis and liver injury. This effect was attenuated by HSC-specific lentiviral delivery of G α_{12} . Moreover, G α_{12} activation promoted autophagy accompanying c-Jun N-terminal kinase-dependent ATG12-5 conjugation. In addition, miR-16 was found to be a direct inhibitor of the *de novo* synthesis of G α_{12} . Modulations of miR-16 altered autophagy in HSCs. In a fibrosis animal model or patients with severe fibrosis, miR-16 levels were lower than in their corresponding controls. Consistently, cirrhotic patient liver tissues showed G α_{12} and LC3 upregulation in desmin-positive areas.**Conclusions:** miR-16 dysregulation in HSCs results in G α_{12} overexpression, which activates HSCs by facilitating autophagy through ATG12-5 formation. This suggests that G α_{12} and its regulatory molecules could serve as targets for the amelioration of liver fibrosis.**Lay summary:** Guanine nucleotide-binding α -subunit 12 (G α_{12}) is upregulated in activated hepatic stellate cells (HSCs) as a consequence of the dysregulation of a specific microRNA that is abundant in HSCs, facilitating the progression of liver fibrosis. This event is mediated by c-Jun N-terminal kinase-dependent ATG12-5 formation and the promotion of autophagy. We suggest that G α_{12} and its associated regulators could serve as new targets in HSCs for the treatment of liver fibrosis.

© 2017 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

IntroductionLiver fibrosis is a scarring response promoting the deposition of extracellular matrix (ECM) components against hepatocyte injury.¹ ECM deposition disturbs normal liver function and architecture and can progress to liver cirrhosis when left untreated. When exposed to various external stimuli during chronic injury, hepatic stellate cells (HSCs) are primarily responsible for the disproportionate fibre accumulation that leads to liver fibrosis. Additionally, HSCs cause ECM deposition through trans-differentiation from a quiescent phenotype to a myofibroblastic phenotype.² However, there is currently no clinically effective way to inhibit HSC activation and fibrosis progression;³ therefore, identification of the regulatory molecules and mechanisms involved in this process could assist in the implementation of new diagnostic and therapeutic targets related to liver fibrosis.Given their roles in complex biological processes, increased attention has been paid to G-protein-coupled receptors (GPCRs), which recognise extracellular ligands, and their related downstream molecules and pathways.⁴ GPCR activation and subsequent downstream activity is promoted by guanine nucleotide-binding α -subunits (G α) proteins. Among these, G α_{12} has attracted particular interest owing to its potent transforming capacity. Specifically, G α_{12} transduces signals to control cell proliferation, migration, and inflammation.^{5,6} Additionally, ligands that promote specific GPCR coupling to G α_{12} [i.e. sphingosine-1-phosphate (S1P), lysophosphatidic acid, angiotensin 2 (Ang II), thrombin, and endothelin-1] are implicated in liver fibrosis.^{7,8} Given that G α_{12} converges signals from multiple GPCRs and coordinates GPCR-specific signalling cascades**Keywords:** Liver fibrosis; Activated stellate cell; G protein; Non-coding RNA; Lysosomal degradation.

Received 31 October 2016; received in revised form 10 October 2017; accepted 17 October 2017

* Corresponding author. Address: College of Pharmacy, Seoul National University, Gwanak-ro-1, Seoul 08826, Republic of Korea.
E-mail address: sgkim@plaza.snu.ac.kr (S.G. Kim).